



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales
Departamento de Industrias

Desarrollo de estrategias alternativas para la conservación post-cosecha de frutillas

Tesis presentada para optar al título de Doctora de la
Universidad de Buenos Aires en el área Química Industrial

Eunice Valentina Contigiani

Directora de tesis: Dra. Stella Maris Alzamora
Directora asistente: Dra. Paula Luisina Gómez
Consejera de estudios: Dra. Ana Rojas

Buenos Aires, 2019

Desarrollo de estrategias alternativas para la conservación postcosecha de frutillas

El **objetivo general** de esta tesis fue desarrollar tratamientos postcosecha de frutilla aplicando tecnologías de conservación alternativas (ozono y pulsos de luz de alta intensidad) como pretratamientos al almacenamiento refrigerado. Dichas tecnologías fueron aplicadas en forma individual o en un enfoque multifactorial entre sí y/o con otro factor de estrés (tratamiento térmico moderado).

El tratamiento con ozono en fase acuosa (concentración máxima: $3,5 \text{ mg.L}^{-1}$) durante 5 min permitió reducir el crecimiento fúngico (micoflora nativa y *Botrytis cinerea*) a lo largo del almacenamiento a $5 \text{ }^{\circ}\text{C}$, sin alterar de forma significativa los parámetros de calidad evaluados. El aumento en el grosor y densidad electrónica de la cutícula, explicaron en parte la disminución del nivel de infección y de pérdida de peso de estas muestras. La combinación de exposición a ozono ($3,5 \text{ mg.L}^{-1}$) por 5 min seguida de 10 s de luz pulsada (LP) ($11,9 \text{ J.cm}^{-2}$) ó 5 min de tratamiento térmico (TT) seguido de 10 s de LP mostraron ser más efectivos para reducir el crecimiento fúngico respecto al tratamiento individual de LP. Sin embargo, ninguno de los tratamientos combinados logró mejorar la inhibición alcanzada con el tratamiento térmico individual de 5 min. De los tratamientos evaluados, sólo el TT de 5 min y su combinación con LP mostraron una mejora en la firmeza de los frutos respecto al control, que fue correlacionada con los cambios microestructurales observados. Además, aquellos tratamientos (individuales o combinados) que resultaron más efectivos en la inhibición de la micoflora nativa no resultaron en cambios significativos en la capacidad antioxidante y los parámetros fisicoquímicos. Por otra parte, el TT de 5 min provocó cambios significativos en las propiedades ópticas de los frutos.

Esta tesis mostró que los tratamientos individuales, aplicados en dosis adecuadas, permitieron reducir el desarrollo fúngico durante el almacenamiento refrigerado. Por otra parte, los tratamientos combinados, si bien redujeron el nivel de infección, no lograron superar los resultados obtenidos con los tratamientos individuales más efectivos. Por lo tanto, para alcanzar una mayor vida útil es preciso profundizar el conocimiento de estas tecnologías, a fines de encontrar las dosis y tiempos de exposición óptimos para ser aplicados de forma combinada entre sí y/o con otros factores de estrés.

Palabras claves: frutilla, ozono, luz pulsada, tratamiento térmico, estructura, propiedades mecánicas y ópticas, micoflora.

Development of new strategies to extend the post-harvest life of strawberries

The **aim** of this thesis was to develop strawberry post-harvest treatments using alternative preservation technologies (ozone and pulsed light) as pre-treatments to refrigerated storage. These technologies were applied individually or in a multi-factorial approach to each other and/ or with other stress factor (mild thermal treatment).

Aqueous ozone exposure (maximum concentration: 3.5 mg.L^{-1}) for 5 min reduced the fungal development (native mycobiota and inoculated *Botrytis cinerea*) along storage at $5 \text{ }^{\circ}\text{C}$, without inducing significant changes in the quality parameters evaluated, when compared to control fruit. The thicker and more electron dense cuticle in these samples would partially explain the reductions in microbial infection and weight loss along storage. Combined treatments of 5 min of exposure to ozone (3.5 mg.L^{-1}) followed by 10 s of pulsed light (PL) (11.9 J.cm^{-2}) or 5 min of mild thermal treatment (TT) followed by 10 s of PL, were effective to reduce fungal incidence when compared to individual PL treatment. Nevertheless, none of the combined treatments assayed improved the inhibition levels achieved with the individual TT of 5 min. Among the treatments evaluated, only the TT of 5 min and its combination with PL improved the firmness of the fruit with respect to control. This improvement was correlated with the micro-structural changes observed in those samples. The treatments (individual or combined) that showed the greater effectiveness in inhibiting the naturally occurring incidence did not showed a significant effect on the antioxidant capacity and the physicochemical parameters. In addition, TT of 5 min had a detrimental effect on the optical properties of the fruit.

This thesis showed that individual treatments, applied in adequate doses, allowed reducing the fungal development throughout refrigerated storage. Although the combined treatments reduced the level of infection, they did not overcome the results obtained with the most effective individual treatments. Therefore, to extend the fruit's shelf life it is necessary to deepen the knowledge of these technologies in order to find the optimum doses and exposure times to be applied in combination between them and with other stress factors.

Keywords: strawberry, ozone, pulsed light, mild thermal treatment, micro-structure, mechanical properties, antioxidant properties, native micobiota, *Botrytis cinerea*, postharvest.

Agradecimientos

Quiero agradecer a Stella y Paula por su dirección durante estos años, la gran dedicación y esmero con los que realizan este trabajo, y la generosidad con la que comparten sus conocimientos hicieron más que placentero este camino. Muchas gracias.

Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) y a la Universidad de Buenos Aires, por el aporte financiero brindado para la realización de esta tesis.

A mis compañeros de trabajo Ángela, Bernarda, Sol, Leti, Mechi, Alondra, Marcela, Mariana, Daniela. En particular, quiero mencionar a Gabriela, que ha sido indispensable para la realización de esta tesis y que en el transcurso de los años hemos construido una hermosa amistad. A Diego, por su gran amistad y compañía en los largos días de trabajo.

A Silva y Lucas por su aporte y orientación en los estudios microbiológicos.

A Julio y Daniel que colaboraron desinteresadamente en el mantenimiento, reparación e innovaciones pretenciosas de los equipos.

A Omar por su amor, aliento y soporte en todo momento.

A mis padres, abuela y hermanas por ser un apoyo constante, acompañarme y aconsejarme en todos estos años a pesar de las distancias. A mis sobrinos, por sus sonrisas, travesuras y ocurrencias.

A la memoria de mi padre

ÍNDICE

1	Objetivos.....	1
1.1	Objetivo general	1
1.2	Objetivos específicos.....	2
2	Introducción.....	3
2.1	Coyuntura actual.....	3
2.2	Frutilla	6
2.2.1	Taxonomía y generalidades.....	6
2.2.2	Producción.....	8
2.2.3	Composición.....	11
2.2.3.1	Compuestos bioactivos.....	11
2.2.4	Descripción del tejido vegetal	15
2.2.5	Principales causas de deterioro.....	19
2.2.5.1	Desarrollo microbiológico.....	19
2.2.5.2	Maduración y senescencia.....	19
2.3	Tecnologías emergentes de conservación.....	21
2.3.1	Ozono	22
2.3.1.1	Definición.....	22
2.3.1.2	Sistemas de generación de ozono.....	22
2.3.1.3	Efecto sobre los microorganismos	23
2.3.1.4	Aplicaciones en alimentos.....	24
2.3.2	Luz UV-pulsada.....	25
2.3.2.1	Definición.....	25
2.3.2.2	Sistemas de luz pulsada.....	25

2.3.2.3	Efecto sobre los microorganismos	26
2.3.2.4	Aplicaciones en alimentos.....	27
2.4	Tratamiento térmico	28
2.4.1	Definición	28
2.4.2	Efecto sobre los microorganismos.....	29
2.4.3	Tratamientos de frutas y vegetales	29
2.5	Tratamientos combinados.....	30
2.6	Evaluación del color	31
2.7	Evaluación de la textura	35
2.8	Evaluación de compuestos bioactivos y capacidad antioxidante	37
2.8.1	Compuestos fenólicos.....	37
2.8.2	Antocianinas	37
2.8.3	Capacidad antioxidante.....	38
3	Materiales y Métodos	41
3.1	Materia Prima	41
3.2	Reactivos y medios de cultivo empleados.....	42
3.3	Tratamientos individuales	44
3.3.1	Tratamiento de ozono en fase acuosa.....	44
3.3.1.1	Descripción del generador de ozono	44
3.3.1.2	Descripción del equipo de ozonización.....	44
3.3.1.3	Determinación de la concentración de ozono disuelto.....	45
3.3.1.4	Condiciones de ozonización de frutillas y tiempos de exposición.....	46
3.3.2	Tratamiento con luz pulsada.....	47
3.3.2.1	Descripción del equipo.....	47
3.3.2.2	Tratamiento de las muestras.....	48

3.3.3	Tratamiento térmico	48
3.3.3.1	Descripción del tratamiento	48
3.3.3.2	Determinación de los perfiles de temperatura.....	49
3.4	Tratamientos combinados.....	50
3.4.1	Combinación ozono-luz pulsada	50
3.4.2	Combinación tratamiento térmico moderado-luz pulsada.....	50
3.5	Almacenamiento de las muestras	51
3.6	Estudios microbiológicos	51
3.6.1	Evolución de la microflora nativa de frutillas.....	51
3.6.2	Evolución de <i>Botrytis cinerea</i> inoculado en frutillas	52
3.6.2.1	Preparación de la suspensión de conidios	52
3.6.2.2	Inoculación de las frutillas	53
3.7	Medición instrumental del color.....	53
3.8	Determinación de la pérdida de peso.....	55
3.9	Medición de las propiedades mecánicas.....	55
3.10	Observación de la estructura	57
3.10.1	Microscopía óptica (MO)	57
3.10.2	Microscopía electrónica de transmisión (MET)	57
3.11	Evaluación de parámetros fisicoquímicos	58
3.11.1	Determinación del pH.....	58
3.11.2	Contenido de sólidos solubles	58
3.11.3	Acidez titulable.....	59
3.11.4	Contenido de humedad	59
3.12	Extracción y determinación de compuestos bioactivos y capacidad antioxidante.....	59
3.12.1	Extracción de compuestos bioactivos.....	60

3.12.2	Determinación del contenido de antocianinas monoméricas totales.....	60
3.12.3	Determinación de compuestos fenólicos totales.....	61
3.12.4	Determinación de capacidad antioxidante (CA).....	61
3.12.4.1	Ensayo TEAC.....	62
3.12.4.2	Ensayo ORAC.....	63
3.13	Análisis Sensorial.....	64
3.13.1	Área de prueba.....	65
3.13.2	Jueces.....	65
3.14	Análisis estadístico.....	68
4	Resultados y discusión.....	70
4.1	Tecnologías alternativas aplicadas como único factor de estrés previo al almacenamiento refrigerado.....	70
4.1.1	Tratamiento individual de ozono en fase acuosa.....	70
4.1.1.1	Concentración de ozono disuelto.....	70
4.1.1.2	Efecto del tratamiento con ozono sobre la respuesta microbiana.....	71
4.1.1.2.1	Evolución de la micoflora nativa de frutillas.....	71
4.1.1.2.2	Evolución de <i>Botrytis cinerea</i> inoculado en frutillas.....	77
4.1.1.3	Efecto del tratamiento con ozono en fase acuosa sobre el color.....	81
4.1.1.4	Efecto del tratamiento con ozono sobre la pérdida de peso.....	84
4.1.1.5	Efecto del tratamiento con ozono sobre las propiedades mecánicas.....	86
4.1.1.6	Efecto del tratamiento con ozono sobre la micro y la ultraestructura.....	91
4.1.1.6.1	Microscopía óptica (MO).....	91
4.1.1.6.2	Microscopía electrónica de transmisión (MET).....	95
4.1.1.7	Efecto del tratamiento con ozono sobre los parámetros fisicoquímicos.....	98
4.1.1.8	Efecto del tratamiento con ozono sobre el contenido de compuestos bioactivos y la capacidad antioxidante.....	102

4.1.1.8.1	Puesta a punto del método de extracción.....	102
4.1.1.8.2	Puesta a punto de las técnicas TEAC y ORAC para la determinación de la capacidad antioxidante.....	111
4.1.1.8.3	Efecto del tratamiento con ozono sobre el contenido de compuestos bioactivos y la capacidad antioxidante de tratamientos seleccionados	114
4.1.1.9	Efecto del tratamiento con ozono sobre los atributos sensoriales.....	120
4.1.1.10	Integración de resultados de la Sección 4.1.1	122
4.1.2	Tratamiento individual de luz pulsada.....	125
4.1.2.1	Efecto de la luz pulsada sobre la respuesta microbiana	125
4.1.2.1.1	Evolución de la micoflora nativa de frutillas.....	125
4.1.2.1.2	Evolución de <i>Botrytis cinerea</i> inoculado en frutillas.....	128
4.1.2.2	Efecto del tratamiento con luz pulsada sobre los parámetros mecánicos	130
4.1.2.3	Integración de resultados de la Sección 4.1.2	134
4.2	Tecnologías alternativas aplicadas en forma combinada previo al almacenamiento refrigerado: Combinación ozono en fase acuosa – luz pulsada.....	136
4.2.1	Efecto de los tratamientos combinados sobre la respuesta microbiana.....	136
4.2.1.1	Evolución de la micoflora nativa	136
4.2.2	Efecto de los tratamientos combinados sobre las propiedades mecánicas ...	139
4.2.3	Integración de los resultados de la Sección 4.2.1	143
4.3	Tecnologías alternativas y tradicionales aplicadas en forma combinada previo al almacenamiento refrigerado: Combinación tratamiento térmico-luz pulsada.....	145
4.3.1	Determinación de los perfiles de temperatura	145
4.3.2	Efecto de los tratamientos combinados sobre la respuesta microbiana.....	146
4.3.2.1	Evolución de la micoflora nativa de frutillas	146
4.3.3	Efecto de los tratamientos sobre el color.....	150

4.3.4	Efecto del tratamiento sobre la pérdida de peso	152
4.3.5	Efecto del tratamiento sobre las propiedades mecánicas.....	155
4.3.6	Efecto del tratamiento en la microestructura de frutillas.....	159
4.3.7	Efecto de los tratamientos sobre las propiedades fisicoquímicas.....	163
4.3.8	Efecto de los tratamientos sobre el contenido de compuestos bioactivos y la capacidad antioxidante	167
4.3.9	Integración de los resultados de la Sección 4.3	174
5	Conclusiones.....	176
6	Bibliografía.....	178

1 OBJETIVOS

1.1 Objetivo general

En la actualidad existe una tendencia global a incentivar el consumo de frutas y vegetales debido a los beneficios para la salud asociados a la ingesta de los mismos. Para satisfacer las tendencias modernas de consumo, la industria debe proveer productos de alta calidad organoléptica, nutricional y funcional que, sumado a los estándares de inocuidad que limitan el acceso a ciertos mercados, presentan un desafío a la hora de establecer tratamientos de conservación post-cosecha.

El presente trabajo se enfoca en la preservación de frutillas, una matriz compleja debido a su tendencia al rápido deterioro durante el almacenamiento, y de gran importancia económica en las provincias productoras del país.

La frutilla es altamente apreciada debido a sus propiedades sensoriales y a sus efectos promotores de la salud por su alta capacidad antioxidante, atribuida principalmente a su contenido de vitamina C, antocianinas y otros compuestos fenólicos (Alexandre y col., 2012). Este falso fruto tiene una vida útil postcosecha muy limitada debido a sus altas velocidades metabólicas y la susceptibilidad al deterioro microbiano, traducidos en rápida deshidratación, pérdida de firmeza, degradación de tejidos y alteración del color (Baka y col., 1999; Bialka y col., 2007; Duarte-Molina y col., 2016), fenómenos que resultan en pérdidas económicas importantes.

El crecimiento de hongos es el principal problema microbiológico. *Botrytis cinerea*, causante de la podredumbre gris, es uno de los patógenos más frecuentes de esta planta, tanto en la pre como en la postcosecha; pero también aparecen las especies *Mucor*, *Rhizopus*, *Collectotrichum* y *Phytophthora* (Barkai-Golan, 2001; Prusky y col., 2010). La incidencia fúngica en la postcosecha depende del nivel de contaminación al final del período de maduración, y la infección es favorecida por el ablandamiento propio del fruto y por daños ocasionados en la epidermis como consecuencia de la manipulación. Los métodos corrientes de control incluyen, además de las Buenas Prácticas Agrícolas, la aplicación de fungicidas sintéticos. Sin embargo, estos químicos no son la mejor solución ya que pueden inducir resistencia en los microorganismos, y representan un riesgo para la salud humana y el ambiente, lo cual ha incrementado las restricciones impuestas por las diversas agencias regulatorias y los mercados (Prusky y col., 2010; Romanazzi y col., 2016). Por ello, en las últimas décadas han surgido alternativas

físicas, químicas y biológicas de inactivación / inhibición microbianas que posibilitan incrementar el período de almacenamiento postcosecha, sin alterar en forma apreciable los atributos de calidad de los frutos (Sy y col., 2005; Allende y col., 2007; Pombo y col., 2009; Zhang y col., 2011; Birmpa y col., 2013; Ramos y col., 2013; Romanazzi y col., 2016).

El **objetivo general** de esta tesis fue estudiar tratamientos postcosecha de frutillas aplicando tecnologías de conservación alternativas (ozono y pulsos de luz), utilizados en forma individual y en un enfoque multifactorial entre sí y/o con otros factores de estrés (tratamiento térmico suave y refrigeración), con el fin de diseñar estrategias combinadas que permitan extender la vida útil con un impacto mínimo en las características organolépticas y funcionales.

1.2 Objetivos específicos

Los **objetivos específicos** fueron:

1. Evaluar la efectividad de distintas dosis de ozono en fase acuosa y de luz pulsada, aplicados individualmente, en la respuesta de la microbiota nativa y de *B. cinerea* durante el almacenamiento refrigerado de las frutillas.
2. Evaluar la efectividad de los factores aplicados en combinación entre sí y con otros agentes de estrés microbiano (tratamiento térmico) en la respuesta de la microbiota durante el almacenamiento refrigerado.
3. Evaluar la respuesta de las características antioxidantes, de color, reológicas y sensoriales de las frutillas a las diferentes dosis de los tratamientos aplicados, después del procesamiento y durante el almacenamiento refrigerado.
4. Analizar las modificaciones a nivel micro y ultra-estructural del tejido de frutilla para algunos tratamientos selectos a fin de interpretar parcialmente los cambios en las propiedades reológicas, ópticas y en la pérdida de peso.
5. Integrar la respuesta microbiana y la de los atributos de calidad a fin de establecer los límites de tolerancia de aplicación de los distintos factores de estrés microbianos, aplicados individualmente o en combinación.

2 INTRODUCCIÓN

2.1 Coyuntura actual

La nutrición es una temática de preocupación a nivel mundial. La malnutrición, desnutrición, carencia de micronutrientes, sobrepeso y obesidad afectan a una alta proporción de la población mundial. Si bien los elevados niveles de desnutrición están íntimamente relacionados con la imposibilidad de acceder a los alimentos, principalmente por cuestiones económicas, los niveles crecientes de sobrepeso y obesidad de los distintos estratos etarios de la población están asociados al consumo de alimentos altos en calorías y grasas, y con azúcar o sal añadidos. Diversos factores influyen en estos cambios de hábitos como ser el nivel de ingresos, los precios de los productos, preferencias individuales, tradiciones culturales, factores geográficos, entre otros. En Argentina en particular, un estudio realizado por Zapata y col. (2016) sobre los cambios de hábitos alimenticios en la población reveló un descenso del 27 % del consumo de frutas y hortalizas no feculentas en el período 1997 - 2013, alcanzando apenas los 227 g diarios.

La ingesta recomendada por la Organización Mundial de la Salud (OMS) es de 400 g por día de frutas y vegetales no feculentos, por lo tanto, también resulta importante la variedad de los frutos y vegetales en la dieta diaria. Es decir, que en Argentina el consumo está significativamente por debajo de lo recomendado. Esto ha incentivado diferentes campañas desde el Estado, siendo la más reciente la denominada "Más frutas y verduras" del Ministerio de Agroindustrias, que pretende elevar el consumo diario de frutas y hortalizas a 700 g. Diferentes actividades se promueven en esta campaña desde reuniones periódicas con el sector productivo y consumidor, hasta eventos públicos donde cocineros profesionales elaboran platos simples utilizando ingredientes de estación. El ministerio de salud ha lanzado campañas publicitarias, dirigidas tanto al público adulto como niños, con las que se busca difundir la importancia de una alimentación saludable y, en cuanto al consumo de frutas y vegetales, se fomenta la ingesta de "diversidad de colores" para incentivar además, la incorporación de una mayor variedad de este tipo de alimentos en la dieta diaria. Algunos ejemplos de ellos se presentan en la **Figura 2.1.**



Figura 2.1. Ejemplos de placas para redes sociales promoviendo la alimentación saludable del Ministerio de Salud de la Nación Argentina.

Los beneficios provenientes de la ingesta regular de frutas y verduras, alimentos con elevados niveles de vitaminas y minerales, ha sido ampliamente estudiado y divulgado en los últimos años. Una dieta que carece de los micronutrientes apropiados puede generar problemas de desarrollo en niños o problemas congénitos si la mujer embarazada no tuvo la alimentación correcta durante el embarazo. Se ha demostrado que una mayor incorporación de frutas y vegetales en la ingesta diaria aporta estos micronutrientes y tiene además un efecto protector frente a algunos tipos de cáncer y enfermedades coronarias crónicas (Rodríguez-Mateos y col., 2014; Tulipani y col., 2014; Gasparrini y col., 2018).

Los cambios de hábitos en la ingesta de este tipo de alimentos conllevaría a un potencial incremento en la demanda de frutas y vegetales frescos, mínimamente procesados, congelados, etc., que desencadenan además la búsqueda de estrategias que aumenten los rendimientos de los cultivos para aumentar la producción, como así también a la mejora en los métodos de preservación y descontaminación que permitan comercializarlos en el mercado interno y exterior sin que impliquen un mayor riesgo de incidencia de enfermedades transmitidas por alimentos (ETAs).

Actualmente, existe aún una gran dependencia en la aplicación de fungicidas sintéticos en los cordones frutihortícolas del país, que no serían la mejor opción dado el impacto ambiental negativo que generan y al elevado riesgo para la salud humana. En un estudio realizado por la organización no gubernamental Naturaleza de Derechos, se han encontrado hasta 30 agroquímicos diferentes en un mismo alimento, incluyendo

algunos prohibidos como el endosulfán y otros de altísima peligrosidad, como el car-bendazim en frutas y hortalizas de consumo diario. Este estudio se realizó mediante la sistematización de los resultados de controles realizados por el Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria (SENASA) que buscan detectar el uso de agroquí-micos en distintos alimentos. En el 55 % de los casos muestreados (en el período 2011 - 2016) el uso de los químicos encontrados no estaba autorizado. Entre los 82 agrotóxicos detectados en 38 frutas, verduras, oleaginosas y cereales, el 44 % son cancerígenos. Los alimentos en los que se aplicaron mayor número de agroquímicos son los cítricos (na-ranja, mandarina, limón, pomelo), la manzana, la banana, la acelga, la frutilla, el apio y la espinaca.

El creciente conocimiento de estos riesgos por parte de los consumidores, suma-do a las restricciones al uso de químicos que ha ido incrementándose tanto por parte de agencias gubernamentales como por parte de grandes cadenas comercializadoras, orien-tadas principalmente a la exportación de productos (Prusky y col., 2010; Romanazzi y col., 2016), conllevan a la búsqueda de nuevas alternativas de procesamiento postcose-cha.

El concepto de calidad en el caso de frutas y verduras puede diferir en ciertos aspectos en función de la óptica del productor/distribuidor o la del consumidor. En el primer caso, los esfuerzos estarán principalmente orientados a conseguir una mayor vida útil, manteniendo mínimas alteraciones en el aspecto del producto de manera que permi-tan su posterior comercialización. En el segundo caso, los sistemas de producción y distribución estarían más atentos a las necesidades y exigencias de los consumidores, lo cual implicaría mayor énfasis en mantener una calidad global del fruto con apariencia prácticamente inalterada. Estos enfoques parecerían contrapuestos, es probable que cier-tos procesamientos postcosecha logren una mejora considerable en la vida útil a expen-sas de un detrimento en la calidad nutricional, el *flavor* o apariencia global del producto. Por el contrario, enfocarse sólo en estos últimos aspectos limitaría el tipo o condiciones de procesamiento a niveles tales que tal vez no resulten los más convenientes desde el punto de vista de la durabilidad del producto, limitando luego su distribución a regiones más alejadas o mercados más convenientes.

Resultaría necesario entonces, confluir ambos enfoques en un objetivo común, que permita elaborar estrategias de preservación que mejoren o mantengan los paráme-tros de calidad exigidos por el público consumidor, durante un período de tiempo acep-

table también por los productores y distribuidores, según sus potenciales mercados de comercialización.

Es la comunidad científica la que se encuentra en el compromiso de desarrollar nuevas estrategias de preservación, que incluyan un enfoque multifactorial, que atiendan a las necesidades de los productores y distribuidores y garanticen la aceptabilidad y satisfacción de los consumidores.

2.2 Frutilla

2.2.1 Taxonomía y generalidades

La frutilla cultivada y silvestre pertenece al género *Fragaria* dentro de la familia Rosaceae. El género *Fragaria* está formado por unas 20 especies, entre ellas *F. chiloensis* Duch, que es originaria de la costa de Chile y zona andina de Argentina, y *Fragaria virginiana* Duch., originaria de las praderas centrales de América del Norte. Mediante la hibridación entre individuos de ambas especies a comienzos del Siglo XVIII en Europa, se dio lugar a la frutilla cultivada *Fragaria x ananassa* Duch, ampliamente difundida a nivel global.

Desde el punto de vista botánico, la frutilla es un eterio o conocarpo originado por la expansión del receptáculo floral carnoso, que constituye la parte comestible de la frutilla. Estrictamente los frutos son los aquenios, que no son otra cosa que los ovarios compartiendo un mismo receptáculo, donde prácticamente están en contacto unos con otros en un arreglo en espiral. Cada aquenio se forma a partir de la unión del gameto masculino (célula espermática) con el gameto femenino (ovocélula). La correcta fusión de los gametos da origen al aquenio. Cada aquenio se encarga de secretar una hormona (auxina) a las células colindantes, dándose un engrosamiento de esa zona. En términos hortícolas, el receptáculo expandido con aquenios se denomina baya. Cada receptáculo puede contener entre 150 – 200 aquenios por fruto, pudiendo llegar incluso hasta 400, dependiendo de la variedad y las condiciones del cultivo (Padmanabhan y col., 2016). Si en algunas zonas del fruto alguno de ellos no se fecunda, no se formarán los aquenios, se dará un engrosamiento desigual y aparecerá una de las fisiopatías comunes en frutilla, la deformación (**Figura 2.2**).

La deformación del fruto es una pérdida de simetría del receptáculo engrosado, que provoca una pérdida en el peso del fruto, una disminución en la calidad y consecuentemente una pérdida económica para el productor.

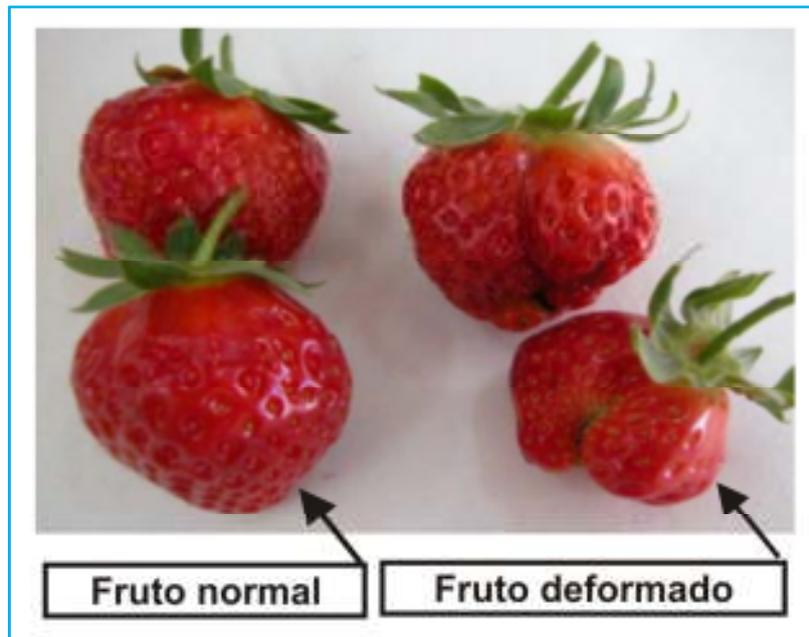


Figura 2.2. Ejemplos de deformaciones de frutillas.

La calidad de la frutilla va a depender de los procesos exitosos del crecimiento vegetativo y reproductivo de la planta, que dependen fundamentalmente de factores ambientales y del genotipo. Los factores ambientales incluyen el fotoperíodo (longitud del día) y termoperíodo (amplitud térmica), la interacción de ambos factores y la acción de reguladores de crecimiento.

El fotoperíodo influye en la formación de yemas florales, elongación de estolones, tamaño de hojas y longitud de los pecíolos. La respuesta a la longitud del día varía considerablemente según genotipos, y dichas diferencias forman la base de clasificación en tipos varietales: de día corto ó de día neutro.

Las plantas que responden al fotoperíodo se denominan de día corto. En estas variedades, las bajas temperaturas y días cortos inducen la floración, con un pico en los meses de junio y julio. Por otro lado, las variedades que no responden al fotoperíodo, son denominadas de día neutro o reflorecientes, ya que pueden producir tres o más picos de floración y producción de frutos durante el año.

El termoperíodo puede modificar e incluso anular los efectos de la longitud del día y debe ser considerada de igual importancia en la determinación de la adaptación de la frutilla a ambientes concretos.

Los cultivares de *Fragaria x ananassa* son el resultado de la hibridación de dos especies con una alta variabilidad de respuesta al foto y termoperíodo. Esto es lo que

posibilita el alto grado de adaptación a distintas condiciones ambientales y su gran divulgación a nivel mundial.

En el caso del cultivar Albion, con el cual se trabaja en la tesis y que pertenece al grupo de día neutro, los picos de producción ocurren entre los meses de noviembre a diciembre, y en menor cantidad en el mes de Abril. Dadas sus características organolépticas y su mayor demanda por parte de cadenas de supermercados en la comercialización interna o para la elaboración de productos Gourmet, tienen un precio superior al resto de los cultivares comercializados en el país.

2.2.2 Producción

La extensión anual del cultivo de frutillas en el país fluctúa entre las 1100 y 1300 hectáreas, siendo las principales provincias productoras Tucumán (40 %), Santa Fe (30%), Buenos Aires (15 %) y, con menor participación, Río Negro y Neuquén (8 %), Corrientes (6 %), y Mendoza (1 %).

Su cosecha se concentra en los meses de Julio a Diciembre para consumo fresco y, en Noviembre y Diciembre para el procesamiento de frutos congelados o conservas. De esta forma se logra exportar la producción en contra estación hacia el hemisferio norte, donde se encuentran los principales consumidores a nivel mundial.

Sin embargo, la mayor parte de la producción, aproximadamente el 60 % de la fruta, se consume fresca y el 40 % se procesa. De esta última, sólo una pequeña fracción (1030 toneladas) se exporta, principalmente a los Estados Unidos (según datos del INDEC- 2017).

La estrategia de los productores en la Argentina radica principalmente en los cultivos multivarietales, y en la elección de los diferentes cultivares y las hectáreas destinadas a cada una de ellas, además de la adaptabilidad del cultivo a la zona geográfica, interviene un factor económico. En este sentido, los productores se encuentran en un compromiso entre tener frutos disponibles en meses más tempranos, donde el precio en el mercado es superior (fruta precoz o primicia), a expensas de disponer del fruto durante mayor cantidad de meses al año, aún cuando los precios de comercialización resulten menores.

En la **Figura 2.3** se presentan los ingresos mensuales promedio y el correspondiente precio de comercialización promedio, correspondientes al período 2009 – 2015 y al año 2016. Podemos observar que, independientemente del período analizado, el precio de comercialización en el mercado interno tiene una importante variación estacional.

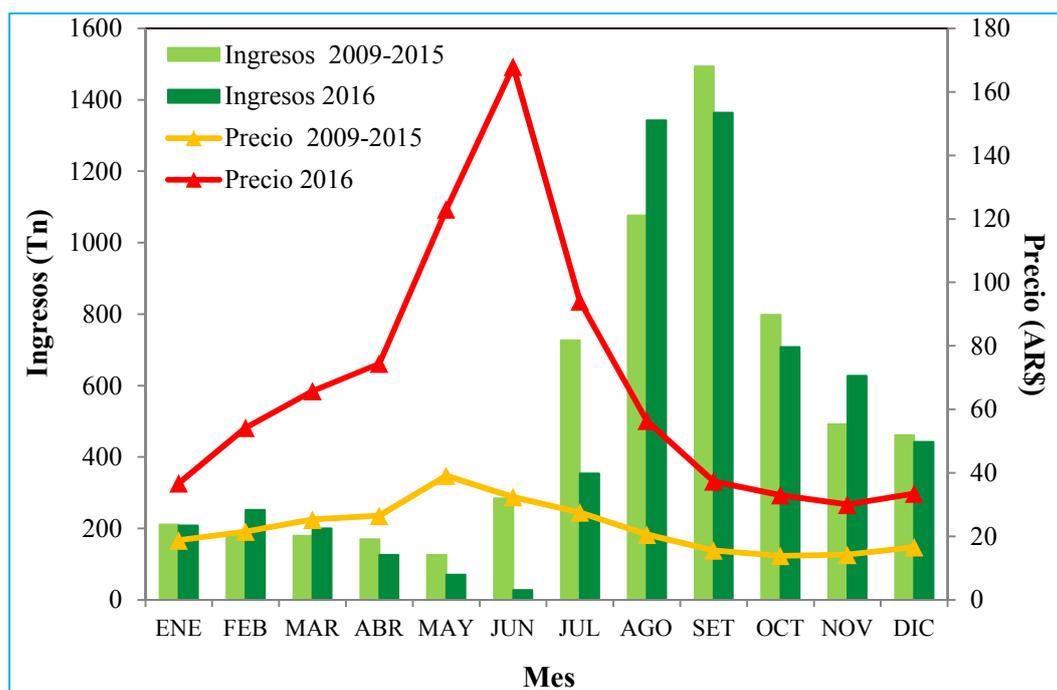


Figura 2.3. Ingresos mensuales promedio (Tn) y precio mensual promedio (AR\$). Elaborado con datos del Mercado Central de Buenos Aires.

Presenta un pico en los meses de Abril y Junio en el cual el nivel de ingreso de producción es mínimo. A partir del mes de Julio la producción aumenta hasta alcanzar un máximo en los meses de Agosto y Septiembre en los cuales el precio por el contrario, cae hasta su valor mínimo y se mantiene hasta el final de la cosecha.

Por otra parte, podemos observar un aumento en el precio promedio correspondiente al año 2016 respecto al período 2009-2015. En este sentido, en la **Figura 2.4** se presenta la evolución del ingreso de producción y del precio de comercialización en el período 2009-2016. Si bien desde el año 2010 no ha habido un incremento significativo en el nivel de consumo interno, sí lo ha habido en el precio de comercialización.

Según un informe ejecutivo elaborado en Mayo de 2017 por la Subsecretaría de Alimentos y Bebidas, dependiente de la Secretaría de Agregado de Valor del Ministerio de Agroindustria de la Nación, el volumen de exportación de frutillas ha seguido una tendencia decreciente en el período 2011 – 2016. Los principales destinos fueron Estados Unidos (55,5 %) y Brasil (38,2 %) mientras que otros países como Canadá y Uruguay tuvieron una participación menor (3,1 y 2,2 %, respectivamente). Cabe destacarse que el 73,8 % del volumen exportado corresponde a frutilla congelada.

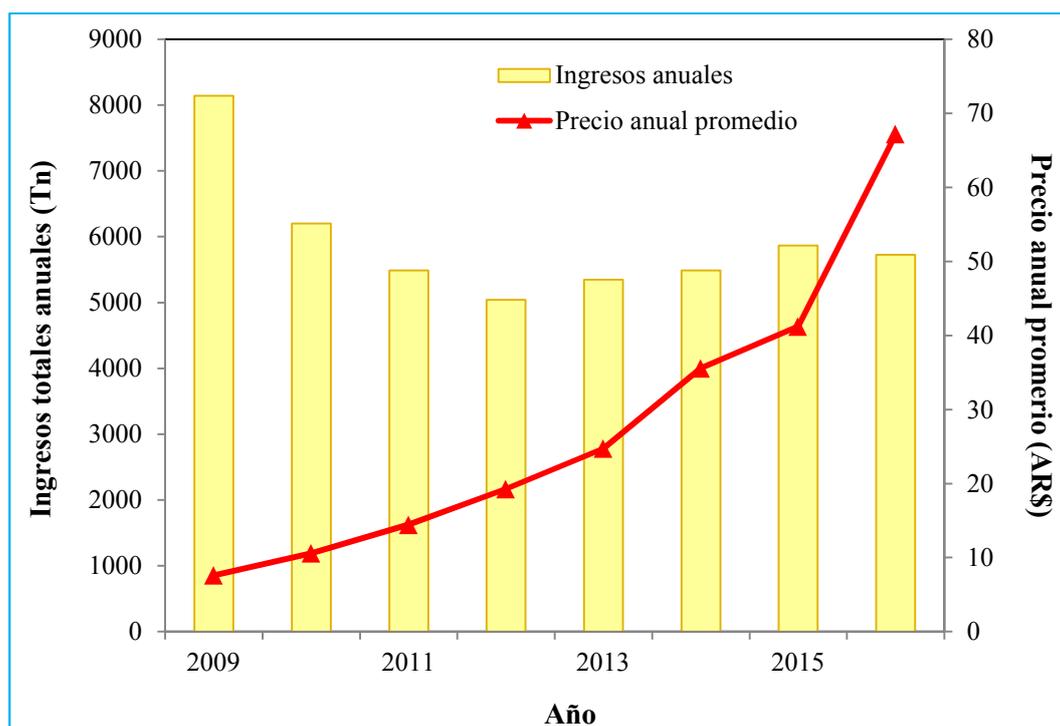


Figura 2.4. Ingresos anuales de frutillas (Tn) y precio anual promedio (ARS). Elaborado con datos del Mercado Central de Buenos Aires.

Esta tendencia a la baja en las exportaciones, según mencionan los autores del informe, podría revertirse en los próximos años dado que hay una tendencia creciente en el consumo de esos frutos en Estados Unidos, países europeos y asiáticos, como Japón y China. Sin embargo, debido a la dificultad de conservar el fruto, la mayoría del comercio se da entre países limítrofes (México y Estados Unidos), aumentando consecuentemente el comercio del producto congelado.

En este sentido, las principales debilidades identificadas en el informe para el sector, son la incidencia económica que representa el mantenimiento sanitario de las plantaciones y del fruto luego de la cosecha, ya que el elevado consumo energético de los procesos de deshidratación y congelamiento utilizados actualmente para preservar los frutos, ha sufrido un incremento en sus tarifas.

En resumen, los avances tecnológicos que resulten en mejoras a lo largo de la cadena productiva de la frutilla, es un tema de interés para el sector. En este sentido la innovación en los tratamientos postcosecha que reduzcan los costos energéticos actuales y permitan extender la vida útil del producto, implicarían una ventaja estratégica tanto para el comercio exterior (hacia países limítrofes en el caso del fruto fresco) como para el doméstico.

2.2.3 Composición

Las frutillas están compuestas principalmente por agua (~ 90 %), y en menor proporción por hidratos de carbono (con una cantidad moderada alrededor del 5 % en su peso), fundamentalmente fructosa y glucosa. Son muy ricas en Vitamina C (con un porcentaje incluso superior al que posee la naranja), y ácido fólico. Entre los minerales se destacan el hierro, calcio, además de fósforo, magnesio y potasio. Contiene diversos ácidos orgánicos, entre ellos el ácido cítrico, málico, oxálico, y también contienen pequeñas cantidades de ácido salicílico. Las frutillas constituyen una de las frutas con mayor capacidad antioxidante, debido a su alto contenido de vitamina C, antocianinas, y compuestos fenólicos (Moreiras y col., 2001).

Tabla 2.1. Composición de la frutilla. Datos expresados en base a 100 g de fruta en base húmeda.

Atributo	Contenido en 100 g b.h.
Agua	90,9
Calorías	41,0
Carbohidratos (g)	7,7
Azúcar total (g)	4,9
Proteínas (g)	0,7
Fibra (g)	2,0
Calcio (mg)	16,0
Potasio (mg)	153,0
Magnesio (mg)	13
Hierro (mg)	0,4
Vitamina C (mg)	58,8
Vitamina B6 (mg)	0,05
Fósforo (mg)	24,0

Fuente: National Nutrient Database for Standard Reference Legaly Release. Departamento de Agricultura, Estados Unidos.

2.2.3.1 Compuestos bioactivos

Los compuestos bioactivos son sustancias no nutritivas que se encuentran en bajas concentraciones en los alimentos y que, mediante la incorporación de los mismos,

ejercen un efecto benéfico para la salud. Algunos de ellos incluyen carotenoides, clorofilas, flavonoides, vitaminas, proteínas y péptidos bioactivos, entre otros. Muchos de estos compuestos presentan, en general, una marcada actividad antioxidante.

Diferentes estudios realizados en los últimos años han demostrado mediante ensayos *in vitro* que la frutilla posee una elevada capacidad antioxidante, y la misma se atribuye al elevado contenido de compuestos fenólicos, específicamente a las antocianinas que son un tipo particular de fenoles, que predominan en la frutilla y son responsables del color de la misma (Aaby y col., 2007; Giampieri y col., 2012; Zhu y col., 2015).

- **Compuestos fenólicos**

Los compuestos fenólicos son antioxidantes particularmente importantes debido a su elevado potencial redox, que les permite actuar como agentes reductores, donadores de átomos de hidrógeno y desactivadores del oxígeno singulete. En términos generales, los compuestos fenólicos pueden dividirse en dos grupos, los ácidos fenólicos y los flavonoides, siendo estos últimos los más abundantes en nuestra dieta.

Todos los flavonoides tienen la misma estructura básica característica (**Figura 2.5**) conformada por dos anillos aromáticos (A y B) a ambos lados del anillo de pirano oxigenado (C). Según el grado y patrón de hidroxilación, metoxilación o glicosilación que puede sufrir esa estructura básica, los flavonoides se clasifican en 6 subgrupos: flavonas, flavonoles, flavanonas, antocianos, flavanoles e isoflavonas.

Los ácidos fenólicos se caracterizan por tener un ácido carboxílico terminal (**Figura 2.6**) y se dividen en dos clases: los que derivan del ácido benzoico, como el ácido gálico y eláxico, y los derivados del ácido cinámico como el ácido cafeico y p-cumárico. El ácido cafeico es el ácido fenólico más abundante en frutas y vegetales, que muchas veces se encuentra esterificado con ácido quínico como en el ácido clorogénico.

Los flavonoles son los principales compuestos fenólicos presentes en la frutilla, dentro de los cuales predominan las antocianinas, seguido por taninos hidrolizados (elagitaninos, galotaninos) y ácidos fenólicos (hidroxibenzoicos e hidroxicinámicos), y en menor proporción los taninos condensados (proantocianidinas) (Kähkönen y col., 2001; Aaby y col., 2005).

- **Antocianinas**

Como se mencionó anteriormente, las antocianinas son el tipo de compuestos fenólicos más abundante en la frutilla y son los responsables del color de las mismas, por lo tanto, son un factor influyente en la calidad del fruto durante la postcosecha.

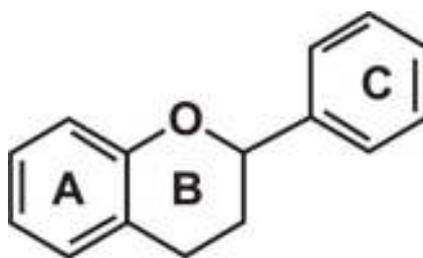


Figura 2.5. Estructura básica de los flavonoides.

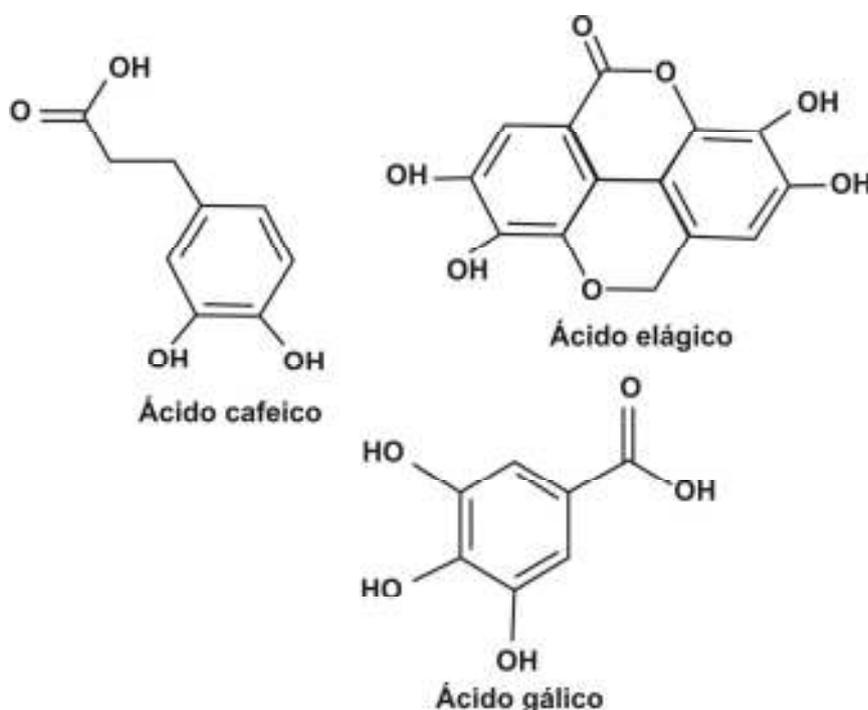


Figura 2.6. Estructura de algunos ácidos fenólicos.

Estructuralmente están compuestas por una aglicona, llamada antocianidina y residuos de carbohidratos. La estructura básica de las agliconas es el ión flavilio o 2-fenil benzopropilo (**Figura 2.7**). Se conocen aproximadamente 20 antocianinas, cuya diferenciación radica en los sustituyentes R_1 y R_2 . Las más abundantes son la pelargonidina, delphinina, cianidina, peunidina, peonidina y la malvadina, donde la raíz del nombre deriva de la matriz vegetal de donde se aislaron por primera vez. La combinación de cada una de ellas con los diferentes azúcares genera aproximadamente 150 antocianinas que abundan en la naturaleza (Badui, 2006).

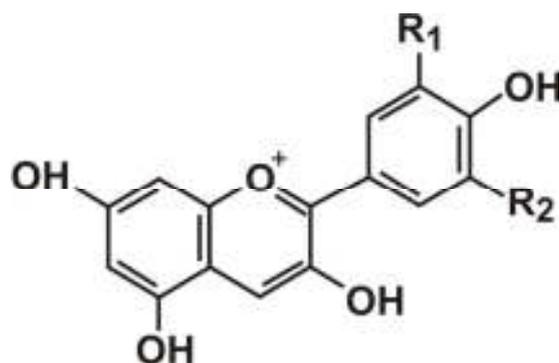


Figura 2.7. Estructura básica de las antocianinas.

Estos pigmentos naturales son capaces de capturar radicales libres por donación de átomos de hidrógeno del grupo fenol, contribuyendo a la capacidad antioxidante de las matrices que las contienen.

Diversos factores influyen en el color de estos compuestos, como los sustituyentes que contiene (R1 y R2) y la posición de los mismos en el grupo flavilio. Por ejemplo, si se aumentan los hidroxilos del anillo fenólico se intensifica el color azul, mientras que los metoxilos provocan los rojos.

Otro aspecto interesante de estos compuestos, que facilita su cuantificación en el laboratorio, es su capacidad de actuar como indicadores de pH. Esto se debe a la carga positiva del núcleo flavilio. A pH bajo, la estructura del catión es estable y de coloración roja mientras que, al aumentar el pH, la distribución electrónica se modifica adquiriendo la forma quinoidal de coloración azul. La hidratación del flavilio produce la base carbinol que es incolora.

La identificación de los compuestos fenólicos y antocianinas en frutillas ha sido reportado por diferentes autores (Aaby y col., 2007; Kajdžanoska y col., 2011; Giamperi y col., 2012), como así también su cuantificación para distintos cultivares y estadios de cosecha (Lopes da Silva y col., 2007; Cerezo y col., 2010; de Souza y col., 2014; Šamec y col., 2016).

La antocianina más abundante en la frutilla es la Pelargonidina-3 glucósido, por lo tanto, el contenido de antocianinas totales se expresa en gramos equivalentes de esta especie. En el caso del contenido de compuestos fenólicos, los resultados se expresan como equivalentes de un estándar como el ácido gálico o la catequina.

2.2.4 Descripción del tejido vegetal

En términos generales podemos considerar a la frutilla como un receptáculo carnoso de numerosas semillas denominadas aquenios. Este receptáculo no es homogéneo por lo que la estructura celular del mismo varía según 5 tipos diferentes de tejidos: tejido epidérmico, subepidérmico, cortical, aquenios y tejido vascular, identificados en la **Figura 2.8**.

La parte más externa está conformada por las células epidérmicas, seguidas de una o más capas de células subepidérmicas y una tercera capa de células corticales denominadas córtex. Los aquenios se encuentran conectados a la médula por medio de haces vasculares.

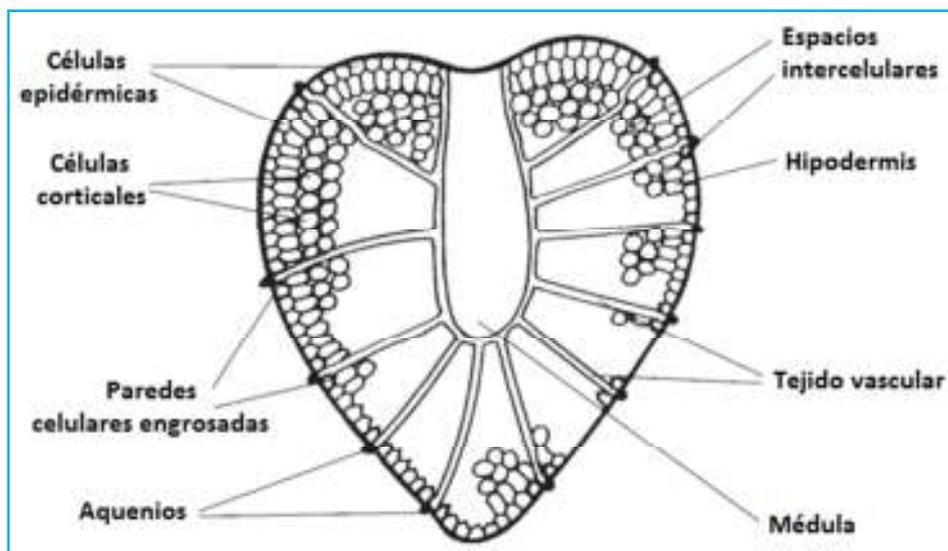


Figura 2.8. Esquematización de los tejidos: epidérmico y subepidérmico (hipodermis), cortical, aquenios y vascular de frutillas. (Suutarinen y col., 1998).

- *Epidermis*

Se denomina epidermis a la capa externa de células que conforman la “piel” de frutas y vegetales y actúan como tejidos protectores que se desarrollan en la superficie de los órganos de las plantas. La organización de las células epidérmicas es similar a la del parénquima, que se caracteriza por ser un tejido poco especializado, con células prácticamente isodiamétricas y facetadas, poliédricas, alargadas o globuladas. En el caso de las células epidérmicas, la disposición de éstas es característica resultando en una estructura más compactada, además de tener una pared celular especializada. Las paredes celulares exteriores de las células epidérmicas, conocidas como pared tangen-

cial externa, son comúnmente más gruesas y están impregnadas de una capa de material lipídico que conforma las ceras epicuticulares (Duckworth y col., 1996).

▪ *Pared tangencial de células epidérmicas y membrana cuticular*

La pared tangencial externa de las células epidérmicas se distingue del resto por su grosor y por la presencia de ceras epicuticulares. La membrana cuticular comprende una capa externa delgada, principalmente continua y una capa interna, considerada como una incrustación de la pared celular. Por lo tanto, la membrana cuticular no es homogénea estructural y químicamente, sino que está compuesta por un número variable de capas definidas en virtud de su posición, organización ultraestructural y composición química (Jeffrey y col., 1976). Las distintas capas identificadas en la pared tangencial externa en las frutillas utilizadas en la presente tesis se enumeran a continuación y se esquematizan en la **Figura 2.9 a**:

- Ceras epicuticulares (ew)
- Membrana cuticular (CM): incluye la cutícula (compuesta por cutina) y la capa cutinizada (compuesta por cutina, ceras intracelulares y polisacáridos)
- Capa péctica (pl, compuesta por polisacáridos pécticos)
- Capa no-cutinizada (cl, compuesta principalmente por micro fibrillas de celulosa, xiloglucanos y polisacáridos pécticos)

Es menester mencionar que las proporciones esquematizadas en la **Figura 2.9 a** entre las distintas capas que componen la pared celular de las células epidérmicas no se mantienen necesariamente en el caso de las frutillas, por lo cual en la **Figura 2.9 b** se muestra una imagen obtenida mediante microscopía de transmisión electrónica de la pared tangencial externa de una frutilla donde se señalizan las capas definidas anteriormente.

La membrana cuticular juega un rol decisivo en la vida postcosecha de los frutos. Las ceras epicuticulares y el espesor y composición de la cutícula están relacionadas con la susceptibilidad de los frutos a la infección de patógenos, la pérdida de agua y la textura de los frutos a lo largo del almacenamiento (Lara y col., 2014).

Las ceras se componen, en su mayoría, de ésteres de ácidos grasos de cadena larga (20 – 24 átomos de carbono) y alcoholes de alto peso molecular (C_{24} – C_{32}), también pueden presentarse alcanos de cadena lineal, aldehídos, cetonas, entre otros componentes minoritarios (Lara y col., 2014).

La cutina es una macromolécula, un polímero de elevado peso molecular formado por una alta proporción de ácidos grasos (C_{16} ó C_{18} saturados o insaturados) unidos entre sí por uniones éster, que forman una estructura tridimensional rígida. En el caso particular de la frutilla, se han identificado dos isómeros del ácido 9,16- y 10,16-dihidroxi hexadecanoico como los principales monómeros constituyentes de la cutina (Järvinen y col., 2010).

- *Células subepidérmicas*

Este tejido se encuentra inmediatamente debajo de las células epidérmicas, está constituido por 3 o 4 capas de células con abundante contenido de compuestos fenólicos y contiene además las células meristemáticas (células de crecimiento) con escasos espacios intercelulares (Suutarinen y col., 1998).

- *Tejido vascular*

Está compuesto por xilema y floema, cumple la función de transporte de materiales dentro de la frutilla. Los haces vasculares se extienden desde la médula atravesando el conocarpo (córtex), las células subepidérmicas y epidérmicas hasta llegar a los achenios. El xilema está conformado por células muertas, que poseen paredes celulares con engrosamientos secundarios que forman anillos, espirales y redes, y es el responsable del transporte de agua. El floema en cambio, es el responsable del transporte de nutrientes orgánicos e inorgánicos producidos durante la fotosíntesis. (Suutarinen y col., 1998). La médula se encuentra rodeada de xilema y floema, sin embargo, las células medulares poseen paredes celulares delgadas que se separan durante el crecimiento de la frutilla, dejando una cavidad grande en el centro (Szczesniak y col., 1969). Sus principales componentes son fibras largas de celulosa, proteínas, pectinas y lignina (Suutarinen y col., 1998).

- *Paredes celulares primarias y laminilla media*

Las paredes celulares primarias están compuestas por microfibrillas rígidas de celulosa unidas entre sí por medio de una matriz de xiloglucanos (hemicelulosa) y pectinas, y menores cantidades de proteínas y fenoles estructurales (Carpita y col., 1993). La laminilla media (región de pared entre células adyacentes) es rica en pectinas y está compuesta principalmente por homogalacturano (HGA, cadena lineal de ácido galacturónico sin sustituyentes). La función de la laminilla media es la de mantener las células unidas entre sí, por lo cual, es la determinante principal de la adhesión intercelular.

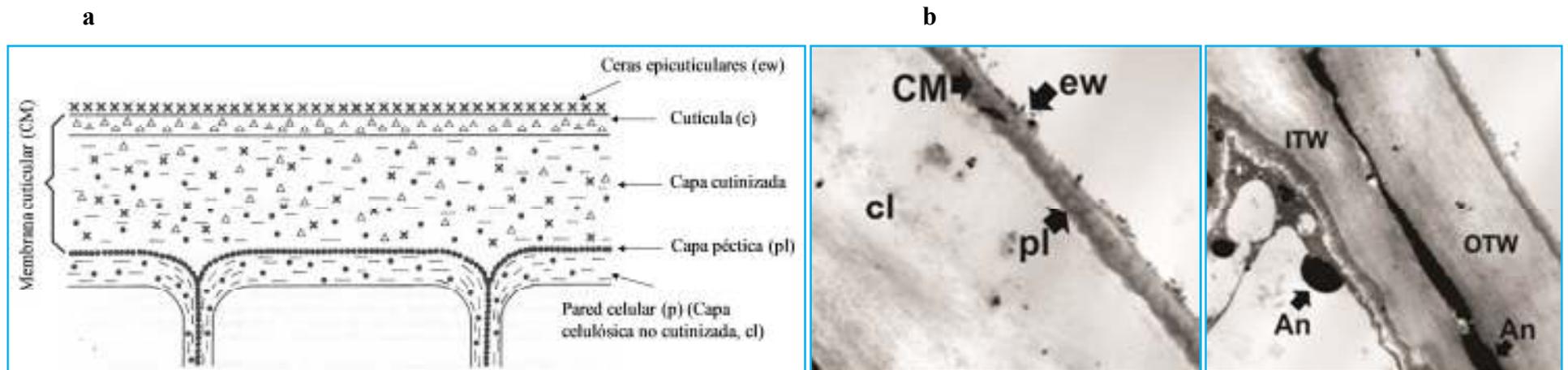


Figura 2.9. (a) Diagrama de la pared tangencial externa de células epidérmicas. x: ceras, Δ : cutina, \bullet : pectinas, —: celulosa. (Adaptado de Lyshede, 1982). (b) Imagen de microscopía electrónica de transmisión del tejido de frutillas. ITW: pared tangencial interna, OTW: pared tangencial externa, An: antocianinas.

Durante el desarrollo de la planta, se produce una carga negativa en el HGA debido a la pérdida de grupos metil éster por acción de la enzima pectinmetilesterasa (PME), dejando grupos carboxilo libres. En la presencia de calcio, el HGA cargado negativamente interactúa con el calcio formando el gel pectato de calcio que confiere rigidez a la pared celular y a las uniones intercelulares (Toivonen y col., 2008).

2.2.5 Principales causas de deterioro

2.2.5.1 Desarrollo microbiológico

La principal enfermedad por microorganismos de la frutilla, tanto en el campo como en el período postcosecha, es el denominado moho gris, causado por el crecimiento de *Botrytis cinerea*. La contaminación con conidios de *Botrytis* se inicia a partir de hojas caídas de la planta, a medida que la hoja muere el patógeno coloniza el tejido y esporula. En todo el proceso la temperatura y humedad son variables claves en la producción del inóculo. Los conidios producidos llegan a las flores al ser dispersados por el aire y agua, y también por la manipulación durante el proceso de cosecha. La infección de las flores es favorecida por períodos prolongados de alta humedad y temperaturas entre los 18 y 23 °C, y conllevan a la formación de micelio inactivo en distintas partes florales que finalmente infectan la frutilla. Las esporas producidas en flores y frutos muertos se convierten en fuentes secundarias de infección durante la cosecha, infectando nuevos frutos o la misma planta (Blanco y col., 2006; Prusky y col., 2010). En la **Figura 2.10** se presenta el ciclo biológico de *Botrytis cinerea* que conlleva a la infección de las plantas y frutos.

Otra enfermedad común de la frutilla es la antracnosis, ocasionada por *Collectotrichum*, que ocasiona manchas circulares y firmes en la frutilla. En caso de humedades ambiente elevadas, las manchas pueden permanecer de color pálido durante unos días pasando luego a un color café oscuro o negro (Zazzetta y col., 2018). Otros responsables de enfermedades de esta fruta son *Rhizopus* y *Phytophthora*, pero en una escala considerablemente menor (Barkai-Golan, 2001; Droby y col., 2007).

2.2.5.2 Maduración y senescencia

La maduración confiere a la frutilla atributos tanto positivos como negativos. La maduración impacta en sus características nutricionales incluyendo el contenido de fibra, nivel de vitaminas y antioxidantes, como así también en el color, sabor y producción de aromáticos que constituyen el *flavor* del fruto (Kalt, 2001).

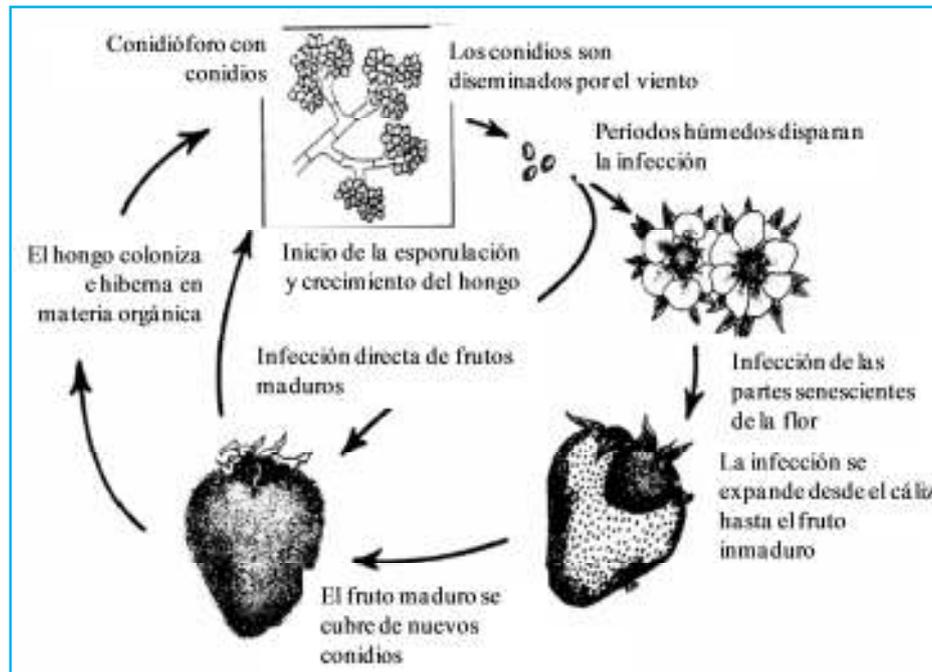


Figura 2.10. Ciclo biológico de *Botrytis cinerea*. (Ellis, 2016).

Los cambios en la firmeza del fruto durante la maduración o posterior período de almacenamiento, incrementan la susceptibilidad al ataque de patógenos, además de tener una textura indeseable para el consumidor. Estos aspectos negativos, son la principal causa de pérdidas postcosecha teniendo consecuentemente, una importancia significativa a nivel comercial y económico (Giovannoni, 2001).

En la mayoría de los frutos carnosos, la calidad textural es generalmente más importante que las propiedades aromáticas (Johnson y col., 2000) y, pese a que las preferencias por ciertos atributos pueden variar en diferentes países, hay una necesidad global de producir frutos firmes, sin desórdenes fisiológicos y libres de patógenos. Los principales eventos metabólicos responsables de los cambios texturales durante la maduración involucran:

- Pérdida de turgencia celular
- Degradación y cambios fisiológicos en la composición de membranas celulares
- Degradación de polisacáridos
- Modificaciones en la estructura y dinámica de la pared celular

Sin embargo, la contribución relativa en el proceso de maduración de cada uno de los aspectos mencionados no está del todo claro y varía entre especies y variedades (Fischer y col., 1991).

La frutilla es un fruto no climatérico de rápido desarrollo y maduración. Tiene la particularidad que la senescencia se superpone con las etapas finales de la maduración (Perkins-Veazie y col., 1995). Las células del tejido vegetal están rodeadas por paredes celulares rígidas que brindan soporte mecánico al tejido. Las paredes celulares de las frutillas contienen una alta proporción de ácido galacturónico, galactosa y residuos de arabinosa, típicos de los polisacáridos pécticos. Durante la maduración, suceden cambios estructurales tanto en la laminilla media como en la pared celular primaria, llevando a la separación entre células y, por lo tanto, al ablandamiento del tejido (Bartley y col., 1982). Estos cambios texturales están acompañados de pérdida de azúcares neutros, solubilización y depolimerización de polisacáridos de la pared celular, disminución en el contenido de la pared celular y reordenamientos espaciales como resultado de la acción combinada de enzimas que actúan en las fracciones pécticas y hemicelulósicas (Rosli y col., 2004; Goulao y col., 2008).

2.3 Tecnologías emergentes de conservación

Las tecnologías emergentes surgen como procedimientos con potencial poder de desinfección que causen los mínimos cambios posibles en la matriz del alimento. Es decir, que posibiliten la obtención de alimentos naturales, *símil frescos*, con un mínimo deterioro en el color, la textura, el *flavor* y el contenido de nutrientes. Al mismo tiempo estas tecnologías deben proveer alimentos con la suficiente vida útil para ser transportados desde su lugar de producción hasta el consumidor (Alzamora y col., 2000; Ngadi y col., 2012).

Entre las tecnologías emergentes y de procesamiento mínimo encontramos:

- alta presión
- campos de pulsos eléctricos
- radiación ionizante
- luz pulsada de alta intensidad
- luz ultravioleta
- ultrasonido de alta intensidad
- ozono
- antimicrobianos naturales

2.3.1 Ozono

2.3.1.1 Definición

El ozono (O_3) resulta de la reordenación de los átomos de oxígeno cuando sus moléculas son sometidas a descargas eléctricas de alto voltaje; la reacción de los radicales libres de oxígeno di-atómico con el oxígeno dan lugar a la formación de moléculas de oxígeno triatómicas. El gas obtenido (ozono) posee un olor característico que es asociado al olor del aire fresco después de una tormenta, es de color azulado a temperaturas ordinarias y tiene fuertes propiedades oxidantes (Zeynep y col., 2003; Patil y col., 2012).

Aunque en bajas concentraciones el ozono no es un gas extremadamente tóxico, las altas concentraciones de este gas pueden ser fatales para los humanos. En los EE.UU., la Administración Federal de Seguridad y Salud Ocupacional (OSHA) especificó límites de exposición al ozono con un umbral de 0,1 ppm para la exposición continua durante un período de 8 horas y de 0,3 ppm durante un período de 15 minutos (Zeynep y col., 2003; Karaca y col., 2007).

El ozono se caracteriza por su alto potencial de oxidación que se traduce en propiedades bactericidas y viricidas. Es un potente agente antimicrobiano de amplio espectro activo frente a bacterias, hongos, virus, protozoos, y esporas bacterianas y fúngicas. Como desinfectante es más eficaz y rápido que el cloro, reacciona con muchos materiales orgánicos y produce menos productos de descomposición (Cullen y col., 2010).

El ozono se descompone en un tiempo muy corto, es parcialmente soluble en agua, relativamente estable en el aire y muy inestable en agua, en consecuencia no puede almacenarse sino que debe generarse *in situ*. El ozono, a 20 °C, tiene una vida media de 20 minutos, y este tiempo aumenta conforme disminuye la temperatura. El único producto de ozono que se genera cuando se descompone es oxígeno; por lo tanto, no deja residuos en los alimentos (Muthukumarappan y col., 2000). Estas ventajas hacen del ozono una tecnología de procesamiento atractiva para la industria alimentaria (Karaca y col., 2007; Cullen y col., 2010).

2.3.1.2 Sistemas de generación de ozono

Existen varios métodos para la generación de ozono: mediante una descarga eléctrica (arcos eléctricos de alta tensión), métodos fotoquímicos (radiación UV), químicos, térmicos, y métodos electrolíticos (Patil y col., 2012).

Como se describirá en secciones venideras, el equipo utilizado en esta tesis se basa en la metodología de descarga eléctrica para la generación del ozono. Brevemente, en este método se utilizan dos electrodos, uno de alta tensión y uno de baja tensión (electrodo a tierra), entre los cuales se interpone un material dieléctrico, generalmente vidrio. El gas de alimentación (oxígeno ó aire) se hace circular entre los electrodos y cuando los electrones tienen la energía cinética suficiente para disociar la molécula de oxígeno, una fracción de éstas colisiona formando la molécula de ozono. La concentración de ozono obtenida depende, entre otros factores, del gas de alimentación utilizado, resultando mayor en el caso del oxígeno.

2.3.1.3 Efecto sobre los microorganismos

El efecto bactericida del ozono ha sido ampliamente estudiado, tanto en bacterias Gram-positivas (*Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Enterococcus faecalis*) como Gram-negativas (*Pseudomonas aeruginosa* y *Yersinia enterocolitica*), esporas y células vegetativas. En cuanto a los microorganismos asociados a alimentos su efectividad ha sido probada, entre otros, en levaduras (*Candida albicans* y *Zygosaccharomyces bailii*), esporas de *Aspergillus niger* y bacterias (Zeynep y col., 2003).

La reactividad del ozono se atribuye al poder oxidante de los radicales libres que se forman a partir de la descomposición del ozono: radicales hidroxilo ($\bullet\text{OH}$), hidropéroxido ($\bullet\text{HO}_2$) y superóxido ($\bullet\text{O}_2^-$), que son los responsables de la inactivación microbiana. Dicha inactivación es un proceso complejo que actúa sobre diversos componentes de la membrana y pared celular, por ejemplo, las grasas no saturadas, y también sobre otros componentes celulares como enzimas y ácidos nucleicos (Cullen y col., 2010).

Los microorganismos son inactivados por la ruptura o desintegración de la envoltura celular, que conduce a la lisis celular. Tanto el ozono molecular como los radicales libres producidos por su descomposición juegan un papel en este mecanismo de inactivación. La disrupción o destrucción de células por lisis asociado con el ozono es un mecanismo de inactivación más rápido que el de otros desinfectantes que requieren la penetración a través de la membrana celular.

La sensibilidad de los distintos microorganismos al ozono es variable, las bacterias son más sensibles que las levaduras y hongos. En particular, las bacterias Gram-positivas son más sensibles que las Gram-negativas y las esporas son más resistentes que las células vegetativas (Pascual y col., 2007).

2.3.1.4 *Aplicaciones en alimentos*

La aplicación más generalizada del ozono ha estado enmarcada en procesos de potabilización. Desde 1982, la Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos (U.S. FDA) reconoció al ozono como Sustancia Reconocida Generalmente como Segura (GRAS) en la industria del agua embotellada y, a partir del 2001 la aprobó para su uso directo en alimentos. Esto ha permitido un incremento acelerado en la introducción del ozono en la industria alimenticia, en el lavado y desinfección de frutas y verduras, y en el procesamiento de jugos para la inactivación de microorganismos patógenos y de deterioro (Cullen y col., 2009; Bataller-Venta y col., 2010). También se ha estudiado su utilización en carne, aves de corral, huevos y alimentos secos (Karaca y col., 2007).

Los tratamientos con ozono pueden realizarse en fase gaseosa como acuosa, dependiendo de la matriz a tratar. Aunque el ozono es altamente efectivo contra los microorganismos en suspensiones de células puras, es poco probable que se utilice directamente en los alimentos cuya demanda de ozono sea alta, ya que los componentes orgánicos de tales alimentos compiten con los microorganismos. Por lo tanto, pueden ser necesarias altas dosis de este agente para la eliminación eficaz de los microorganismos, y estos altos niveles de ozono también pueden alterar los atributos sensoriales, y afectar negativamente la aceptabilidad de los alimentos (Karaca y col., 2007).

En el caso del uso del ozono en frutas y vegetales, existen reportes donde la actividad antimicrobiana del ozono no sólo sería consecuencia del daño oxidativo de componentes celulares vitales que conllevan a la inhibición del desarrollo microbiano, sino también a un efecto indirecto asociado a la inducción de mecanismos de defensa de la matriz vegetal asociada. Esta respuesta resulta dosis-dependiente y está asociada a la inducción de sistemas antioxidantes, la acumulación de compuestos fenólicos con actividad antimicrobiana, refuerzos de paredes celulares, entre otros (Kangasjärvi y col., 1994; Sandermann y col., 1998; Minas y col., 2010).

El tratamiento de frutas y hortalizas ha sido estudiado e incluso implementado en diferentes condiciones y escalas, permitiendo alcanzar elevados niveles de desinfección y generando efluentes con una menor carga contaminante respecto a otras alternativas. El lavado con agua ozonizada puede realizarse mediante mecanismos de aspersión con duchas o bien por inmersión. En este último, el agua puede ser previamente ozonizada ó se puede burbujear el gas en el agua con el empleo de difusores o eyectores; este

burbujeo facilita el contacto con la matriz a tratar, y por lo tanto, requiere menores concentraciones que en el caso de la aspersión.

2.3.2 Luz UV-pulsada

2.3.2.1 Definición

La radiación con luz pulsada (LP) es una nueva tecnología destinada a la descontaminación de la superficie de alimentos mediante la aplicación de pulsos de corta duración y alta frecuencia de un amplio espectro, rico en luz UV-C. El espectro de emisión abarca longitudes de onda de la región ultravioleta al infrarrojo cercano (100-1100 nm) (**Figura 2.11**). El principio de funcionamiento se basa en la acumulación de alto voltaje de descarga en un capacitor (durante fracciones de segundos) y la liberación brusca de la energía acumulada a la lámpara de Xenón en tiempos muy cortos (millones o centenares de fracción de segundo) (Gómez-López y col., 2007).

Esta tecnología ha recibido muchos nombres en la literatura científica: pulsos de luz UV-C (Sharma y col., 2003), pulsos de luz de amplio espectro de alta intensidad (Roberts y col., 2003), pulsos de luz (Rowan y col., 1999) y pulsos de luz blanca (Marquenie y col., 2003).

2.3.2.2 Sistemas de luz pulsada

Las lámparas de luz pulsada contienen gas xenón y se encuentran conectadas generalmente a un módulo controlador mediante un cable de alta tensión. Están recubiertas externamente con un alambre muy fino que sirve de conductor cuando se aplica un disparo de alto voltaje. Normalmente la lámpara se encuentra en un circuito abierto. Cuando se aplica el disparo de voltaje, el gas xenón que contiene la lámpara se ioniza. Si el voltaje es lo suficientemente alto, el gas xenón actúa como conductor y la descarga que se produce genera la emisión de un pulso de luz en la región UV/visible. El espectro de emisión está determinado por la densidad de corriente que existe dentro de la lámpara. Generalmente, altas densidades de corriente conducen a la emisión de un espectro rico en la región UV-C. Para disipar el calor generado en la lámpara como así también para evitar la acumulación de altos niveles de ozono producidos por las longitudes de onda más cortas, generalmente las lámparas se encuentran conectadas a una ventilación, la cual genera un flujo de corriente de aire filtrado que pasa continuamente por dentro de la caja que contiene la lámpara (Manual Xenon corp.).

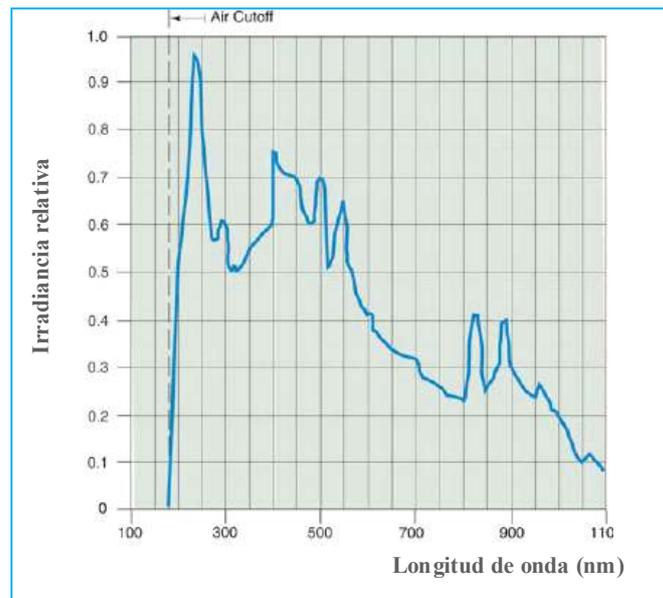


Figura 2.11. Espectro de emisión de luz producido por los sistemas de luz pulsada. Datos obtenidos Manual instructivo Xenon Corp.

2.3.2.3 Efecto sobre los microorganismos

Diversos mecanismos serían responsables de la inactivación de microorganismos en los tratamientos de luz pulsada. La mayor contribución a la inactivación estaría dada por el mecanismo fotoquímico, que involucra el efecto provocado por la región UV del espectro de emisión (entre 220 a 290 nm), la cual es dañina para la mayor parte de los microorganismos, ya que altera el ADN a través de la formación de dímeros de pirimidina, aductos de pirimidina y entrecruzamientos ADN proteínas, bloqueando de esta manera la replicación celular (Gómez-López y col., 2007; Wang y col., 2005). Además de los cambios fotoquímicos producidos por la región UV, también estarían involucrados cambios fototérmicos producidos por el sobrecalentamiento momentáneo causado por la absorción de la luz. Wekhof (2000) propuso que utilizando una dosis superior a $0,5 \text{ kJ.cm}^{-2}$ la desinfección se logra mediante la ruptura de la bacteria durante el sobrecalentamiento momentáneo causado por la absorción de la luz emitida por la lámpara. Fine y col. (2004) sugirieron que el sobrecalentamiento podría causar vaporización y generar un pequeño flujo de vapor que causaría la destrucción de membranas. También estarían involucrados efectos fotofísicos, relacionados con daños estructurales provocados por la absorción de los altos picos de energía, como daño en paredes celulares, en-

cogimiento de membranas, elución de contenido intracelular, expansión de vacuolas, entre otros (Takeshita y col., 2003; Krishnamurthy y col., 2010; Ferrario y col., 2014).

Existen discrepancias en los estudios reportados sobre la susceptibilidad que presentan los diferentes microorganismos a la luz pulsada. Anderson y col. (2000) y Rowan y col. (1999), informaron que la susceptibilidad de los microorganismos a la luz pulsada decrecía en el siguiente orden: bacterias Gram-negativas, bacterias Gram-positivas y esporas de hongos. El color de las esporas puede jugar un rol significativo en la susceptibilidad de las mismas al tratamiento. Las esporas de *Aspergillus niger* son más resistentes que las de *Fusarium culmorum*, lo que podría deberse a que los pigmentos de *A. niger* absorben más en la región UV-C que los de las esporas de *F. culmorum*, protegiendo a la espora contra la radiación UV-C (Anderson y col., 2000).

Farrell y col. (2009) reportaron variaciones significativas en la sensibilidad de diferentes especies de *Candida*, que también dependió de la dosis utilizada. En contraste con esto, Gómez-López y col. (2005) no observaron ningún patrón de sensibilidad entre los diferentes grupos de microorganismos, luego de estudiar 27 bacterias, levaduras y hongos.

La sensibilidad de los microorganismos a la luz pulsada está determinada por diversos factores, desde las características genéticas, que determinan la habilidad de con-trarrestar o reparar los daños inducidos en la célula por la irradiación con luz pulsada, propiedades estructurales de la célula, la composición de la membrana celular o la pigmentación de la misma, que condicionaría la absorción de determinadas regiones del espectro y, por lo tanto, protegiendo las estructuras internas de la radiación incidente (Kramer y col., 2016).

2.3.2.4 Aplicaciones en alimentos

Al tratarse de una tecnología que aún se encuentra en desarrollo y en evaluación de potenciales aplicaciones, existe un menor número de trabajos reportados en bibliografía que estudian la aplicación de la LP en alimentos. Hoornstra y col. (2002) estudiaron la inactivación de microorganismos presentes en la superficie de vegetales. Encontraron reducciones en el recuento aeróbico mayores a $1,6 \log \text{CFU.cm}^{-2}$ en los diferentes vegetales evaluados, utilizando una dosis de $0,30 \text{ J.cm}^{-2}$. Gómez y López (2005) reportaron una reducción en el recuento de mesófilos aeróbicos entre $0,56$ y $2,04 \log \text{CFU.cm}^{-2}$ en diferentes vegetales mínimamente procesados (espinaca, radicheta, lechuga, zanahoria, pimientos y repollo blanco) y en brotes de soja luego del tratamiento con

más de 200 pulsos. Marquenie y col. (2003) reportaron una inactivación máxima de 3 a 4 unidades log de *Botritis cinerea* y *Monilinia fructigena in vitro*. Sin embargo, cuando se inoculó *B. cinerea* en frutillas la luz pulsada no fue efectiva para lograr su inactivación.

Los efectos, tanto en el nivel de descontaminación como en distintos parámetros de calidad, son diferentes según el alimento estudiado. Ramos-Villaruel y col. (2012) reportaron reducciones superiores a 3 unidades log de *E. coli* y un detrimento en el color y textura de sandía mínimamente procesada. Por el contrario, Luksiene y col. (2013) lograron reducciones de 1,5 y 1 log para *Bacillus cereus* ATCC 12826 y *L. monocytogenes* en frutillas, con dosis tales que no afectaron el aspecto visual ni la calidad global de los frutos.

El estudio de la aplicación de esta tecnología como tratamiento postcosecha de frutas y hortalizas está aún en desarrollo y requiere de la determinación de las dosis adecuadas para cada caso en particular, dado que además del efecto sobre el microorganismo objetivo, estimulan respuestas naturales de defensa en la matriz vegetal, que en muchos casos contribuyen a una mayor resistencia a microorganismos patógenos y a una mejora en los atributos de calidad del producto (Duarte-Molina y col., 2016; Urban y col., 2018).

También resulta indispensable estudiar el potencial de aplicabilidad de esta tecnología a nivel industrial, que hasta la fecha sólo se ha implementado para la desinfección de material de embalaje (Kramer y col., 2016).

2.4 Tratamiento térmico

2.4.1 Definición

En la actualidad, la aplicación de calor es el método de procesamiento más común a nivel mundial, por su habilidad de inactivar microorganismos y enzimas deteriorativas (Rawson y col., 2011). Innumerables productos alimenticios son sometidos a distintos tratamientos térmicos desde lácteos, enlatados, jugos de frutas, entre otros. El tratamiento térmico de un alimento depende de varios factores como: la termorresistencia de los microorganismos y enzimas presentes en el alimento, la carga microbiana inicial que contenga el alimento, el pH y estado físico del alimento. En el caso de frutas y verduras frescas, el uso de altas temperaturas se aplica como pre-tratamiento para una

deshidratación o congelación, con el fin de inhibir ciertos microorganismos patógenos o enzimas deteriorativas del propio alimento.

2.4.2 Efecto sobre los microorganismos

En el caso de los tratamientos térmicos moderados, que son los normalmente aplicados a productos frutihortícolas, la efectividad para reducir las pérdidas ha sido ampliamente documentado. El tratamiento térmico minimiza las pérdidas postcosecha, ya sea en forma directa inactivando o provocando alguna injuria en los microorganismos o bien, de forma indirecta afectando las respuestas fisiológicas del tejido de la fruta a través de la inducción de sustancias antifúngicas como proteínas relacionadas con la patogénesis (quitinasa y β -1,3 glucanasa) y/o mediante la inhibición de síntesis de enzimas hidrolizantes de la pared celular (Vicente y col., 2005; Lara y col., 2006; Dotto y col., 2011)

2.4.3 Tratamientos de frutas y vegetales

Existen numerosos estudios sobre la aplicación de tratamientos térmicos con el objetivo de extender la vida útil de diversas frutas y vegetales (Pongener y col., 2018). La exposición a temperaturas mayores a 35 °C inhibe los procesos de maduración en distintas frutas (Paull y col., 1990; Lurie y col., 1998). Estos tratamientos térmicos denominados “suaves” han demostrado ser efectivos para inhibir el desarrollo fúngico y disminuir la proporción de frutos infectados en manzanas (Fallik y col., 2001), ananá (Wijiratnam y col., 2005) y mandarinas (Hong y col., 2007). La aplicación de tratamientos térmicos en frutillas ha sido investigada por diferentes autores y desde distintos enfoques (García y col., 1995; Civello y col., 1997; Marquenie y col., 2002; Dotto y col., 2011). Sin embargo, las diferencias en las condiciones operativas, ya sea de tiempos y temperaturas de exposición ó si se utilizan baños de agua caliente o vapor de agua, los distintos cultivares utilizados y condiciones de almacenamiento (Lara y col., 2006), dificulta la comparación entre los estudios existentes y la obtención de conclusiones respecto al efecto del tratamiento térmico en los parámetros de calidad del fruto. Por ejemplo, Jing y col. (2010) reportaron que la exposición de frutillas durante 20 s a aire caliente a 60 °C redujo significativamente la infección de frutos durante el almacenamiento, mientras que Martínez y col. (2008) lograron extender la vida útil de frutillas y retardaron el ablandamiento de las mismas durante el almacenamiento con tratamientos de aire caliente a 45 o 48 °C durante 3 horas. García y col. (1995) reportó que la inmersión de frutillas cv. Tudla en agua a 45 °C durante 15 minutos, redujo el nivel de infección,

incrementó el contenido de sólidos solubles y disminuyó la acidez titulable, todos efectos que mejorarían la aceptabilidad de los consumidores.

Como se mencionó anteriormente, distintos resultados han sido reportados en el caso de frutillas, que se deben entre otros factores al estado de madurez del fruto al momento de la cosecha, el cultivar utilizado, las características del tratamiento térmico aplicado y las condiciones de almacenamiento (García y col., 1995; Vicente y col., 2002; Martínez y col., 2008).

La disparidad de resultados observados en la efectividad del tratamiento térmico y la limitación en el tiempo de exposición para evitar efectos negativos en la calidad visual de los mismos, contribuye a la búsqueda de tratamientos combinados a fines de reducir la temperatura o el tiempo de exposición, que permitan el control microbiológico y atributos de calidad aptos para el consumidor (Bhat y col., 2015).

2.5 Tratamientos combinados

Se estima que en países en vías de desarrollo, las pérdidas postcosecha exceden el 30 % de la producción debido a la falta de infraestructura o a una infraestructura inadecuada para la manipulación, almacenamiento y elaboración eficiente de la producción agrícola. El alto costo de las tecnologías de procesamiento, la falta de información o de un apropiado conocimiento técnico de los procesos también son factores que influyen en las pérdidas ocasionadas. Las tecnologías combinadas que no requieren el uso de equipo, materiales y procedimientos sofisticados, y que son relativamente simples comparadas con las tecnologías tradicionales, son una alternativa interesante para la preservación de frutas y hortalizas (Alzamora y col., 2004).

El objetivo de las tecnologías de obstáculos es seleccionar y combinar factores de conservación o barreras de forma tal de lograr la estabilidad del alimento, reteniendo las características nutricionales y sensoriales (Leistner, 1992). Este método usa varias barreras que separadamente pueden no dar una adecuada preservación, pero que cuando se las combina pueden brindar la protección necesaria. Las barreras pueden incluir la disminución de la temperatura, pH o actividad de agua; el calentamiento mínimo, o la aplicación de antimicrobianos (Alzamora y col., 2015). Para que este concepto sea aplicado exitosamente es necesario cuantificar la influencia de los distintos factores sobre la población microbiana y los diferentes factores de calidad que influyen en la aceptabilidad del producto final (Alzamora y col., 2005; Alzamora y col., 1995).

El diseño inteligente de tecnologías puede ser utilizado para demostrar las interacciones intrínsecas entre los factores de preservación. Las interacciones antagónicas ocurren cuando dos o más factores de preservación interactúan disminuyendo la respuesta inhibitoria esperada a partir de las observaciones de la efectividad individual de dichos factores. Las interacciones sinérgicas ocurren cuando la combinación de distintos factores de preservación producen una mayor acción inhibitoria que la esperada por la acción individual de los factores. Los efectos aditivos o indiferentes están comprendidos entre las acciones antagónicas y sinérgicas. El primer concepto se refiere a la inhibición obtenida cuando la combinación de las barreras resulta en la adición de los efectos de los factores aplicados en forma separada; mientras que el segundo concepto se refiere a que el efecto combinado no excede o es igual al mayor efecto individual observado.

En general, muchas de las tecnologías emergentes, aplicadas a niveles tales que no tengan un impacto significativo en la calidad del alimento, son procesos que no alcanzan el nivel de inhibición/inactivación microbiológica de otros tratamientos convencionales. Por lo tanto, sólo pueden pensarse en el marco de sistemas combinados o multifactoriales de conservación para lograr la mayor inhibición del crecimiento/destrucción de la flora resistente a algún(os) de los factor(es) de preservación.

2.6 Evaluación del color

El color es un atributo de calidad importante en frutas y vegetales, cuya percepción suele constituir el primer paso en la evaluación de estos productos por parte del consumidor y es condicionante de su elección. La sensación del color es un fenómeno psicofísico, el cual es sólo parte de la percepción visual total de la información detectada por el ojo e interpretada por el cerebro, en la cual influyen tres factores fundamentales: las propiedades espectrales de la fuente de luz que iluminan el objeto, la naturaleza del material observado y del proceso visual humano (MacDougall, 2002).

El sistema visual tiene la capacidad de discriminar entre radiaciones de distinta longitud de onda determinando su “color” a través de un complejo mecanismo trivariante, por lo tanto, el color es una característica tridimensional, cuyas tres dimensiones corresponden a un atributo de claridad, percibido por células especializadas de la retina llamadas bastones, y dos atributos cromáticos, percibidos por otras células especializadas llamadas conos. Hay tres conjuntos de conos: uno sensible al rojo, el otro al verde y

el otro al azul, y la respuesta total es la combinación de las tres señales en el cerebro (Lozano, 1978).

En los alimentos el factor más importante que influye en la luz reflejada es la difusión debido a las características físicas de la superficie. De forma general puede afirmarse que la reflexión ocular ocurre en un ángulo de 90° respecto a la luz incidente y es la responsable principal del brillo del material, mientras que la reflexión difusa ocurre en un ángulo de 45° y es la principal responsable del color. Estas particularidades son importantes al momento de efectuar mediciones porque del ángulo de incidencia de la luz en la muestra y la posición de ésta con respecto al sensor, determinarán el color medido.

Para estandarizar las comparaciones la Comisión Internationale de l'Eclairage (CIE) ha establecido fuentes de luz estándar: el iluminante A tiene una distribución energética similar a la luz emitida por una lámpara incandescente de tungsteno, el iluminante B corresponde a la luz solar con componente de cielo a medio día, el iluminante C tiene una distribución energética similar a la luz blanca solar (difusa, cielo cubierto), el iluminante D corresponde a la irradiación de la luz solar directa. Otras de las variables a fijar es el ángulo del observador ó campo visual. Cuando se miran objetos la información general proviene de ángulos de $10\text{-}20^\circ$, pero cuando se observan detalles, el ángulo es de 2° . En general, en colorimetría de alimentos se emplea este último.

El cálculo necesario para obtener los valores triestímulo CIE para un objeto se esquematiza en la **Figura 2.12**. El valor del estímulo visual es la resultante de una combinación del espectro de la luz incidente (E vs λ) con el espectro de la muestra (R vs λ) y con las funciones de distribución de la sensibilidad del ojo para cada uno de los tres primarios imaginarios (S vs λ).

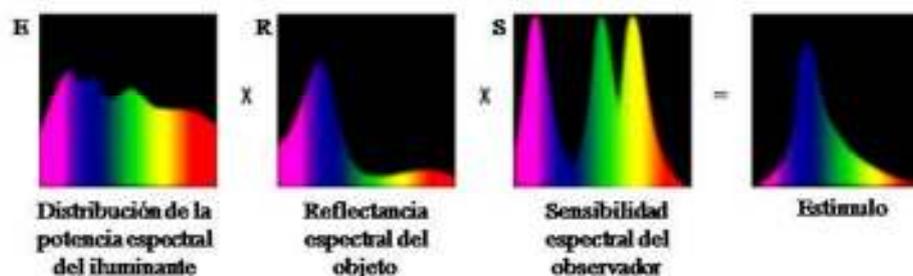


Figura 2.12. Suma de radiaciones espectrales que conforman el estímulo o flujo radiante que percibe el observador.

El área bajo la curva resultante se integra en el espacio visible para obtener los valores numéricos de la contribución de cada uno de los tres primarios ideales (X, Y, Z) al color dado.

En los espectrofotómetros actuales este cálculo se realiza automáticamente por un sistema de computación acoplado al instrumento. De esta manera el color queda determinado por un punto en un espacio tridimensional de coordenadas X, Y, Z. Sin embargo, la forma habitual de representación es calcular las llamadas coordenadas cromáticas x-y definidas por las **ecuaciones 2.1 y 2.2**, respectivamente:

$$x = \frac{X}{X+Y+Z} \quad (\text{Ec. 2.1})$$

$$y = \frac{Y}{X+Y+Z} \quad (\text{Ec. 2.2})$$

El color definido por (x, y) se representa en el diagrama cromático CIE (**Figura 2.13**) donde sólo tiene lugar la cromaticidad del color en cuestión. Para que la especificación del color sea completa, eventualmente se utiliza la luminosidad Y como tercera coordenada, en un plano perpendicular que representa la propiedad de reflejar más ó menos luz. El plano de las coordenadas cromáticas está delimitado por una línea recta que une los extremos del espectro visible, conocida como línea de púrpuras (Kelly, 1943).

El espacio CIE 1931 es muy sencillo de manejar y es excelente para representar mezclas aditivas, pero no es homogéneo (distancias geométricas iguales no suelen representar diferencias de color iguales en la percepción por el ojo humano). Para subsanar el problema de su no uniformidad se han desarrollado una serie de transformaciones del espacio CIE que permiten obtener mejores resultados en la evaluación de la diferencia de color.

Así surgen las transformaciones CIELab (1974) y CIELuv (1976). El CIELuv es una transformación lineal del espacio cromático CIE. En cambio, líneas rectas en el espacio CIE corresponden a líneas curvas en el espacio CIELab. El espacio CIELab es un espacio de color rectangular de 3 dimensiones basado en la teoría de colores opuestos que se representa en la **Figura 2.14**.

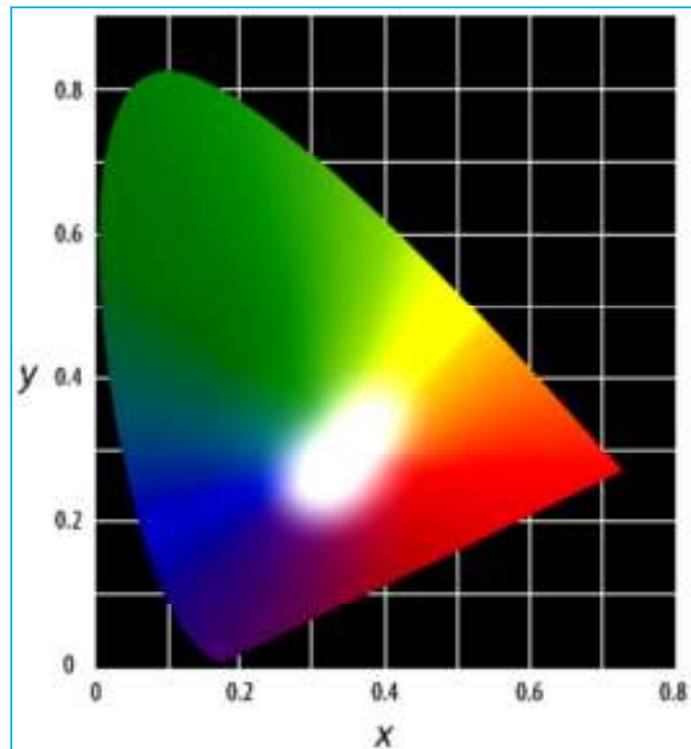


Figura 2.13. Diagrama cromático CIE.

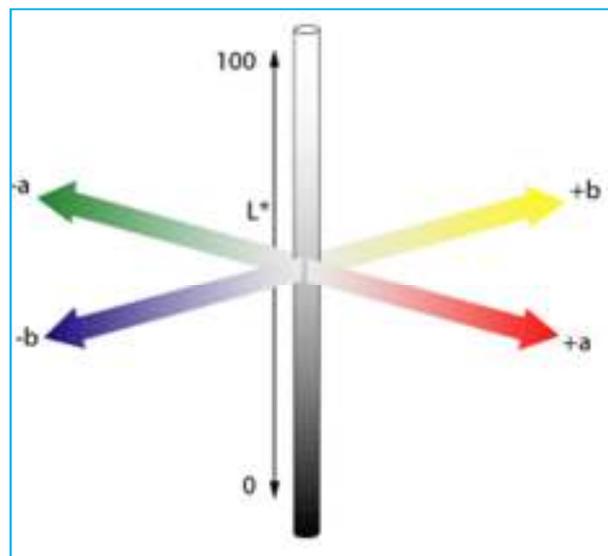


Figura 2.14. Diagrama del espacio CIELab.

Hay dos escalas de color populares de este espacio en uso hoy en día, Hunter Lab y CIE $L^*a^*b^*$. Aunque son similares en organización, un mismo color tendrá valores diferentes en estos dos espacios. Ninguna de las dos escalas es visualmente uniforme.

Hunter Lab se concentra en la región azul del espacio de color y CIEL*a*b* se expande en la región amarilla. La recomendación actual de la CIE es usar la escala CIEL*a*b*.

Las ecuaciones de transformación del espacio CIE a CIE L*a*b* son las siguientes:

$$L_{ab}^* = 116 \times \left(\frac{Y}{Y_n} \right)^{1/3} - 16 \quad (\text{Ec. 2.3})$$

$$a^* = 500 \times \left[\left(\frac{X}{X_n} \right)^{1/3} - \left(\frac{Y}{Y_n} \right)^{1/3} \right] \quad (\text{Ec. 2.4})$$

$$b^* = 200 \times \left[\left(\frac{Y}{Y_n} \right)^{1/3} - \left(\frac{Z}{Z_n} \right)^{1/3} \right] \quad (\text{Ec. 2.5})$$

donde L_{ab}^* es el parámetro *luminosidad* que toma valores entre 0 (negro) y 100 (blanco); a^* es la coordenada cromática en el eje de las abscisas (rojo-verde); b^* es la coordenada cromática en el eje de las ordenadas (amarillo-azul); X,Y,Z son los valores triestímulo; X_n, Y_n, Z_n son los valores correspondientes al iluminante.

Dentro de este espacio es posible definir otras funciones que pueden ser indicativas de determinados atributos de color, como la saturación y el tono. Estas funciones son la cromaticidad o croma métrica (C^*) y el ángulo de tono (h).

2.7 Evaluación de la textura

La textura es uno de los más importantes pero menos entendidos atributos de calidad en frutos y vegetales. Para los consumidores, es uno de los componentes críticos a la hora de estimar la calidad de los frutos cuyas características sensoriales tales como firmeza, jugosidad y crocancia, entre otros, contribuyen a la textura (Harker y col., 1997; Szczesniak, 2002).

Los atributos mecánicos y texturales de frutos y vegetales están relacionados, entre otros, con características estructurales, ultraestructurales, fisiológicas y bioquímicas de las células y paredes celulares; con los cambios ocurridos durante la maduración y con las alteraciones generadas por procesos realizados en la industria de alimentos. El desarrollo de métodos y la solución de muchos problemas para comprender las propiedades texturales de un fruto es una cuestión compleja que requiere fundamentalmente un buen entendimiento de la anatomía del mismo, en particular conocer la disposición y

tipo de tejido que lo conforman, analizar aspectos citológicos, fundamentalmente la pared y la presión de turgor, a los que deben sumarse los cambios biológicos que ocurren durante la postcosecha (Silva y col., 2005; Chaïb y col. 2007).

Las mediciones instrumentales de las propiedades mecánicas son generalmente utilizadas para evaluar la textura del fruto. Los métodos instrumentales para evaluar la textura consisten en ensayos mecánicos, pero los instrumentos consideran generalmente una sola propiedad física en forma aislada y, como se mencionó anteriormente, la textura es una combinación de sensaciones múltiples. La medición instrumental es preferible a la evaluación sensorial para aplicaciones científicas y comerciales porque reduce la variación entre mediciones debido a factores humanos, son más precisas y pueden proveer un lenguaje común entre investigadores, empresas, agencias reguladoras y consumidores (Abbott y col., 1997; Harker y col., 1997). El ensayo de firmeza Magness-Taylor, es el más ampliamente usado para medir la textura en frutos y valora la fuerza máxima necesaria para comprimir una muestra según una dada modalidad (Abbott, 2004). Este sistema fue especialmente desarrollado para evaluar la calidad comercial de los frutos versus la valoración táctil de la firmeza realizada por los consumidores a la hora de efectuar la compra.

Para medir firmeza en frutos en periodos de cosecha y postcosecha son muy usados también los ensayos de penetración o punción por su fácil implementación (Desmet y col., 2002; Camps y col., 2005; Silva y col., 2005). Con este ensayo se mide la fuerza máxima de punción requerida para que la punta cilíndrica de metal (acero) penetre el fruto o incluso lo atraviese totalmente en caso de frutos no-homogéneos. Los equipos actuales permiten el monitoreo de la penetración de la punta en el fruto entero, a una velocidad determinada y se realiza un registro completo de la curva fuerza versus desplazamiento. Se considera a la curva entera fuerza-desplazamiento como un indicador de las propiedades del epicarpo y el mesocarpo (Camps y col., 2005).

Es de destacar que la firmeza, como se mide en la punción, es una combinación de estiramiento y compresión en proporción variable, por lo tanto no es posible convertir mediciones hechas entre puntas MT (Magness-Taylor) de distinto tamaño, ni realizar conversiones precisas partiendo de valores obtenidos con puntas de distintas geometrías.

Entre los parámetros que se pueden obtener de las curvas de punción figuran la fuerza (F_R) y la deformación (D_R) en el punto de ruptura de la epidermis y el módulo de deformabilidad (E_d). En alimentos, el término módulo de deformabilidad (E_d) es usado en vez de módulo de elasticidad, y se obtiene de la pendiente de la curva de esfuerzo vs

deformación en un rango de deformación definido, donde la deformación se aproxima a cero (Monhsenin y col., 1977) ó de la región lineal de la curva si es que existe (Rebouillat y col., 1988).

2.8 Evaluación de compuestos bioactivos y capacidad antioxidante

2.8.1 Compuestos fenólicos

Los compuestos fenólicos se han vuelto de gran interés en los últimos años por ser agentes que pueden contrarrestar el deterioro del organismo. Es por esto que múltiples investigaciones y desarrollos tecnológicos se han estudiado con el fin de cuantificar estas propiedades, relacionadas con su capacidad de quelar metales, inhibir enzimas como la lipoxigenasa y la peroxidasa, además de capturar radicales libres.

El método de Folin-Ciocalteu (FC) (Folin y Denis, 1915) es una técnica analítica conveniente con buena reproducibilidad para la determinación de compuestos fenólicos totales en materiales biológicos. La precisión de los resultados obtenidos usando este método está determinada por los estándares utilizados, el orden de adición de los reactivos, y el reactivo de Folin-Ciocalteu (FCR). Los compuestos fenólicos son determinados basados en la reducción de Mo^{6+} a Mo^{5+} , obteniendo un color azul que puede ser medido ópticamente a 760 nm (Huang y col., 2005).

Este método tiene algunas desventajas, principalmente su carencia de especificidad. Aunque el método FC produce resultados predecibles en un amplio rango de fenoles, estos resultados pueden verse afectados por otros compuestos no-fenólicos, como azúcares, ácido ascórbico, ácidos orgánicos y hierro (II) (Prior y col., 2005; Rover y col., 2013). La cantidad de fenoles totales en la muestra es usualmente indicada por su equivalente con el contenido relativo de catequina o ácido gálico, los cuales son usados como estándares cuantitativos (Liang-Yu y col., 2013).

El método FC es conveniente y simple, no requiere de equipos particulares y puede ser útil en la caracterización y estandarización de muestras botánicas (Prior y col., 2005).

2.8.2 Antocianinas

Las antocianinas son compuestos fenólicos, específicamente del grupo de los flavonoides. Al ser las responsables del color rojo de las frutillas, es adecuado cuantificar su contenido por separado del resto de los compuestos fenólicos. Las antocianinas

confieren la mayoría de los tonos rojos, azules y púrpuras a frutas, granos, vegetales, hojas y flores (Delgado y col., 2000; Welch y col., 2008).

El método espectrofotométrico de pH diferencial es una de las técnicas utilizadas para medir antocianinas totales (Giusti y col., 2001). Este método es una modificación de otros previos descritos por Fuleki y Francis (1968a, 1968b). Las muestras son diluidas con buffer de pH 1,0 y 4,5 y la absorbancia es medida donde se presenta el máximo de absorción correspondiente a la solución de pH 1,0. La diferencia entre la absorbancia resultante de las dos soluciones de buffer se debe a los pigmentos de antocianinas monoméricas. Los pigmentos de antocianinas polimerizadas y pigmentos de pardeamiento no enzimático no presentan comportamiento reversible con el pH, por esto quedan excluidos del cálculo. Es costumbre calcular el total de antocianinas usando el peso molecular y el coeficiente de extinción molar de la antocianina con mayor presencia en la muestra de la matriz (Giusti y col., 1999).

2.8.3 Capacidad antioxidante

Un antioxidante es definido como una molécula capaz de disminuir o prevenir la oxidación de otras moléculas (Sies, 1997), mientras que un antioxidante biológico ha sido definido como cualquier sustancia que, cuando está presente en concentraciones bajas en comparación a las de un sustrato oxidable, retrasa o previene significativamente la oxidación de ese sustrato (Halliwell, 1995).

Los antioxidantes neutralizan los radicales libres, cediéndoles el electrón que les falta y convirtiéndolos en moléculas estables. Muchas de las reacciones químicas de los antioxidantes pueden ser agrupadas en la categoría de transferencia de átomos de hidrógeno (HAT) y transferencia de un único electrón (SET). El mecanismo de HAT ocurre cuando un compuesto antioxidante extingue radicales libres mediante la donación de átomos de hidrógeno. El mecanismo SET describe los casos donde un antioxidante transfiere un único electrón para ayudar en la reducción de un compuesto.

La capacidad antioxidante de un producto o alimento está relacionada con los componentes capaces de proteger un sistema biológico del daño potencial debido a los procesos o reacciones, incluyendo especies reactivas de oxígeno y nitrógeno (ROS y RNS, respectivamente).

En base a los mecanismos de reacción, los principales métodos para la medición de la capacidad antioxidante se han dividido en dos categorías, coincidentes con el me-

canismo de reacción de los antioxidantes: reacción de transferencia de átomos de hidrógeno (HAT) y reacción de transferencia de electrones (ET).

La disociación de enlace y el potencial de ionización son dos de los principales factores que determinan el mecanismo y la efectividad de los antioxidantes. Los mecanismos ET y HAT casi siempre ocurren juntos en todas las muestras y diferenciarlos puede resultar difícil (Karadag y col., 2008; Navas y col., 2012).

Dentro de los métodos HAT se encuentra el método ORAC. El ensayo ORAC ha sido utilizado para evaluar la capacidad antioxidante de muestras de frutas y vegetales, suplementos dietarios, vinos, jugos y nutracéuticos. Este método mide la capacidad de los antioxidantes de inhibir la oxidación inducida por radicales peroxilo y refleja la actividad antioxidante mediante la extinción de radicales por medio de la transferencia de un átomo de hidrógeno (Ou y col., 2001). En el ensayo, los radicales peroxilo generados por la descomposición térmica del AAPH en buffer acuoso, reaccionan con una sonda fluorescente, para formar un producto no fluorescente, disminuyendo la fluorescencia del conjunto. La reacción de la sonda con los radicales peroxilo se sigue por la pérdida de la intensidad de la fluoresceína en el tiempo. Para la cuantificación de la muestra, se confecciona una curva de calibración a partir de soluciones de un patrón (Trolox) de distintas concentraciones que se hacen reaccionar con la fluoresceína, se incuba a 37 °C y se añade la solución de AAPH para iniciar la reacción (MacDonald-Wicks y col., 2006).

El ensayo de la capacidad antioxidante como equivalentes de Trolox (TEAC) es un método que incluye ambos mecanismos de reacción, HAT y SET, es aplicable tanto para antioxidantes lipofílicos como hidrofílicos. El método consiste en la utilización de un radical artificial que se genera a partir de un precursor (ácido 2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolín)-6-sulfónico) que da el nombre al radical "ABTS^{•+}". El radical obtenido es un compuesto verde-azulado intenso, estable y con un espectro de absorción en la región UV-visible, que permite seguir su extinción mediante un método espectrofotométrico sencillo (Re y col., 1999). El radical es oxidado por los compuestos con actividad antioxidante a determinar en la muestra, ocasionando la decoloración del radical, y se mide mediante la inhibición óptica complementaria, a una longitud de onda de 734 nm. De la misma manera que en el método ORAC, la cuantificación se realiza mediante una curva de calibración utilizando Trolox como estándar.

Las principales desventajas de esta metodología son la utilización de un radical sintético completamente ajeno de los sistemas vivos y la dificultad en encontrar el punto

final de la reacción, es decir, el tiempo de incubación tras el cual se determina la absorbancia.

Dado que todas las metodologías presentan ciertas ventajas y desventajas, para la determinación de la capacidad antioxidante de extractos naturales, es preciso la utilización de más de una metodología para poder arribar a conclusiones e incluso para realizar comparaciones con la bibliografía existente.

3 MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Materia Prima

Un aspecto crucial para evaluar el efecto de los tratamientos realizados sobre las frutillas, es la elección del cultivar del fruto con la cual realizar los experimentos. Diferentes cultivares pueden presentar diferentes propiedades texturales, antioxidantes, y fisicoquímicas, como pH, acidez, contenido de azúcares, e incluso diferente composición de volátiles, aún cuando fueran expuestos a las mismas condiciones ambientales hasta el momento de cosecha (Samykanno y col., 2013; Šamec y col., 2016). Es por ello que, a fines de atribuir las diferentes respuestas a los estímulos ocasionados por los tratamientos postcosecha evaluados, el cultivar utilizado debe ser una constante. La elección del mismo se realizó teniendo en cuenta diversos aspectos, enumerados a continuación:

- Localización del cultivo: permite establecer las condiciones ambientales a las cuales estuvieron expuestos los cultivos, la fecha de cosecha, edad del fruto e historia térmica al momento de ingreso al laboratorio.
- Rendimiento comercial: permite estimar la disponibilidad del fruto en cuanto a cantidad y meses del año.
- Propiedades organolépticas y resistencia a plagas: las características organolépticas definen el interés comercial, estableciendo precios diferenciales para los productores y un mayor interés en la prolongación de la vida útil de los mismos. Siendo el objetivo evaluar diversos tratamientos postcosecha, aquellos cultivares que fueran desarrollados con el fin de ser más resistentes a los patógenos que ocasionan su deterioro, no brindarían resultados representativos a la hora de definir un posible tratamiento.
- Fechas de vigencia de las patentes correspondientes a los plantines: este último punto es de suma importancia, pues garantiza la disponibilidad de un mismo cultivar a lo largo del desarrollo de esta tesis.

Luego del análisis de los factores antes mencionados, se optó por utilizar frutillas (*Fragaria x ananassa* Duch.) cultivar Albion. Las mismas fueron adquiridas en forma directa a un productor por medio del Mercado Central de Buenos Aires, cuyos cultivos estaban ubicados en la zona de Pilar, provincia de Buenos Aires. Los frutos

fueron cosechados durante las primeras horas de la mañana del día en que fueron transportados al laboratorio.

A fines de obtener un lote homogéneo, fueron descartados aquellos frutos con anomalías morfológicas, visiblemente deteriorados por desarrollo microbiano, daño mecánico u otros ó que no tuvieran 100% color rojo. Los frutos seleccionados fueron clasificados por su tamaño en grandes, medianos y chicos (mayor a 4, entre 3 y 4, menor a 3 cm de diámetro mayor, respectivamente) (**Figura 3.1**); luego se armaron los grupos experimentales con igual cantidad de cada tamaño.

Se realizaron además determinaciones de acidez (% p/p de ácido cítrico), sólidos solubles (°Brix) y humedad (% en base húmeda) para establecer las características iniciales de cada lote utilizado en los ensayos, acorde a la metodología que se describirá en la **Sección 3.11**. Los valores de acidez, contenido de sólidos solubles y humedad de las muestras, se presentan al final de este capítulo.

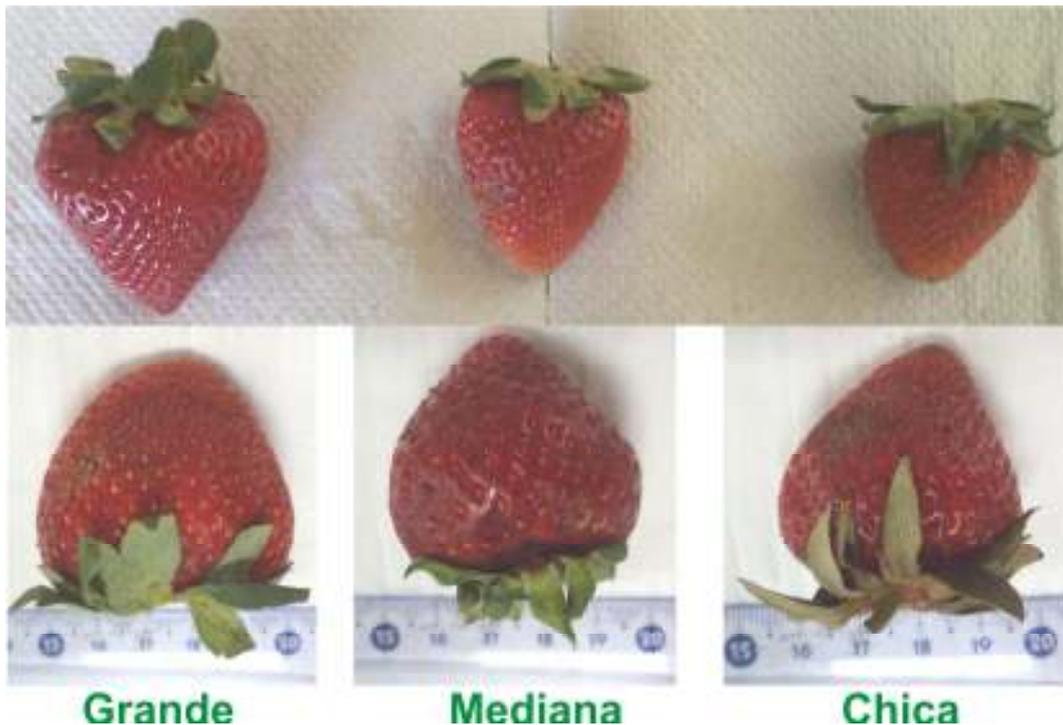


Figura 3.1. Clasificación de las frutillas en función de su tamaño.

3.2 Reactivos y medios de cultivo empleados

- AAPH ((2,2'-azobis (2-amidino-propano) dihidroclorado) (Sigma-Aldrich, Estados Unidos)

- ABTS⁺· (2,2-azinobis-[3-etilbenzotiazolina]-6-sulfónico) (Sigma-Aldrich, Estados Unidos)
- Acetato de sodio (C₂H₃NaO₂) (Biopack, Argentina)
- Acetato de uranilo (UO₂(CH₃COO)₂·2H₂O) (Sigma-Aldrich, Estados Unidos)
- Acetona ((CH₃)₂CO) (Biopack, Argentina)
- Ácido clorhídrico (HCl) (Biopack, Argentina)
- Ácido fosfórico concentrado (H₃PO₄) (Biopack, Argentina)
- Ácido gálico (C₇H₆O₅) (Sigma-Aldrich, Estados Unidos)
- Agar extracto de malta (MEA) (Merck, Alemania)
- Alcohol etílico 96 ° (C₂H₅OH) (Sanicol, Argentina)
- Azul de toluidina (Sigma-Aldrich, Estados Unidos)
- Carbonato de sodio (Na₂CO₃) (Biopack, Argentina)
- Citrato tri-sódico dihidrato (Na₃C₃H₅O(COO)₃·2H₂O) (Merck, Alemania)
- Cloruro de potasio (KCl) (Mallinckrodt, Estados Unidos)
- Dihidrógenofosfato de potasio (KH₂PO₄) (Merck, Argentina)
- Dihidrógenofosfato de sodio dihidrato (NaH₂PO₄·2H₂O) (Merck, Argentina)
- Fluoresceína (C₂₀H₁₂O₅) (Sigma-Aldrich, Estados Unidos)
- Glutaraldehído (OHC(CH₂)₃CHO) (Merck, Argentina)
- Hidrógenofosfato de potasio (K₂HPO₄) (Merck, Alemania)
- Hipoclorito de sodio (NaClO) (cloro activo: 55 g.L⁻¹, C+P, Argentina)
- Ioduro de potasio (KI) (Biopack, Argentina)
- Nitrato de plomo (Pb(NO₃)₂) (Sigma-Aldrich, Estados Unidos)
- Peptona de carne (Britania, Argentina)
- Persulfato de Potasio (K₂S₂O₈) (Biopack, Argentina)
- Reactivo Folin Ciocalteau (FCR) (Merck, Alemania)
- Resina Spurr (Merck, Argentina)
- Tetróxido de osmio (OsO₄) (Merck, Argentina)
- Trisulfonato potásico de índigo (C₁₆H₇N₂O₁₁S₃K₃) (Sigma-Aldrich, Estados Unidos)
- Trolox (C₁₄H₁₈O₄) (Sigma-Aldrich, Estados Unidos)
- Tween 80 (Biopack, Argentina)

Todos los reactivos utilizados fueron calidad pro análisis a excepción del alcohol etílico y el hipoclorito de sodio.

3.3 Tratamientos individuales

3.3.1 Tratamiento de ozono en fase acuosa

3.3.1.1 Descripción del generador de ozono

Para la generación de ozono *in situ* se utilizó un ozonizador por descarga corona UTK-O-4 (Unitek S.A., Argentina); el mismo estaba diseñado para generar ozono en forma continua a partir de oxígeno o aire como gas de alimentación. El gas de alimentación pasaba a través de unos tubos de generación, entre un electrodo y un dieléctrico, espacio denominado “brecha dieléctrica”. Esta brecha o separación es el lugar donde se aplicaba energía eléctrica al gas base, se producía la disociación de las moléculas de oxígeno y su consecuente transformación en ozono (**Figura 3.2**).

La cantidad de ozono generada depende de varios factores:

- Caudal, temperatura y presión de oxígeno
- Voltaje y frecuencia aplicada en la cámara de reacción
- Pureza del gas de alimentación

El gas de alimentación utilizado fue oxígeno de alta pureza. La presión de trabajo fue establecida en 9 psi mediante una válvula reguladora modelo LRP-1/4- 2,5 (Festo, Argentina). El caudal de oxígeno se ajustaba a un valor de 5 L.min⁻¹ mediante un rotámetro (Unitek S.A., Argentina) y se trabajaba al 99% de la potencia nominal del equipo, obteniendo así una concentración de ozono de 18 ± 2 mg.L⁻¹ a la salida del generador.

3.3.1.2 Descripción del equipo de ozonización

Para los tratamientos con ozono en fase acuosa se utilizó una columna de burbujeo de 10 cm de diámetro interno y 24 cm de altura, que poseía en la parte inferior un disco perforado que cumplía la función de difusor. El ozono proveniente del generador se inyectaba por la parte inferior de la columna, atravesaba el difusor y generaba así el burbujeo y agitación de los frutos. El excedente de ozono en la corriente gaseosa, que no había sido disuelto en el agua, salía de la columna y burbujeaba en dos trampas en serie de ioduro de potasio al 2% (p/v), con el fin de ser neutralizado antes de su venteo por la campana. En la **Figura 3.3** se presenta la configuración del generador, la columna y las trampas de KI.

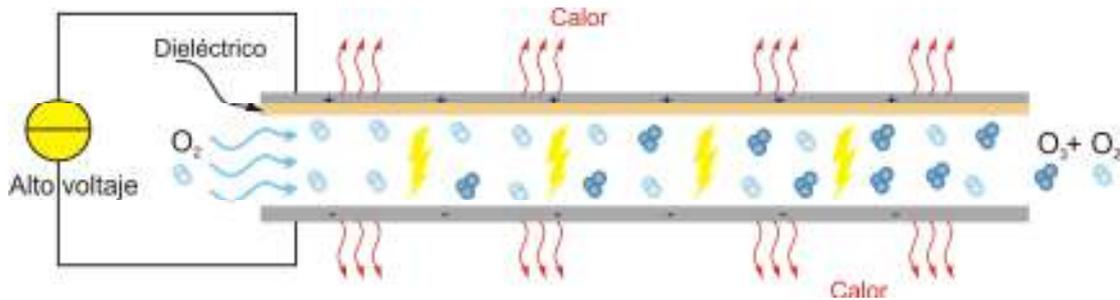


Figura 3.2. Representación de la generación de ozono en la brecha dieléctrica.



Figura 3.3. Configuración del equipamiento para la ozonización de frutillas.

3.3.1.3 Determinación de la concentración de ozono disuelto

La determinación de ozono disuelto en el agua se realizó por el método espectrofotométrico de índigo, según la metodología especificada por Bader y Hoigné (1982). La misma consiste en la preparación de dos soluciones; la primera, denominada solución Índigo de almacenamiento (**SM**), se obtuvo disolviendo 0,077 g de trisulfonato potásico de índigo y 0,1 mL de ácido fosfórico concentrado, y luego se aforó hasta 100 mL con agua bidestilada. En función de la cantidad de ozono que se estimaba tener disuelto y la posible presencia de interferencias en el agua (calcio, cloro, magnesio, etc.) se eligió la dilución a realizar. Dado que las experiencias se realizaron con agua destila-

da, se realizó la solución Índigo reactivo (**SII**) que consistió en una dilución 1:20 de la **SM**, para la cual se agregaron 5 mL de **SM**, 0,5 g de dihidrógenofosfato de sodio y 0,35 mL de ácido fosfórico concentrado; finalmente se aforó con agua bidestilada hasta un volumen final de 50 mL.

Esta última solución **SII** es la que se utilizó para reaccionar con el agua ozonizada. La solución sufre una decoloración cuya magnitud, reflejada en una caída de la absorbancia, se relaciona con la cantidad de ozono disuelto. Las proporciones de solución **SII** y agua ozonizada utilizadas fueron: 1 mL **SII**, 8,5 mL de agua destilada y 0,5 mL de agua ozonizada. El blanco consistió en 1 mL **SII** y 9 mL de agua destilada. La absorbancia se midió en un espectrofotómetro modelo V-630 (JASCO, Japón) a una longitud de onda de 600 nm.

Los resultados fueron expresados en $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de acuerdo a la **Ecuación 3.1**.

$$\text{mg O}_3\cdot\text{L}^{-1} = \frac{V_t \times \Delta\text{Abs}}{f \times b \times V} \times 100 \quad (\text{Ec. 3.1})$$

donde: V_t es el volumen total (10 ml), ΔAbs es la diferencia de absorbancia entre muestra y blanco, b es el paso óptico de la cubeta (1 cm), V es el volumen de la muestra (0,5 mL), y f es el coeficiente de absorción molar del ozono ($0,42 \text{ L}/\text{mg O}_3\cdot\text{cm}^{-1}$).

Se realizaron dos tipos de determinaciones de ozono disuelto. En primer lugar, para caracterizar la configuración elegida para los tratamientos, se burbujeó ozono en 1,25 L de agua destilada. Se extrajeron muestras de 0,5 ml a intervalos regulares de tiempo de 1 min, hasta cumplir 15 min de ozonización. En segundo lugar, se repitió la experiencia anterior pero esta vez la columna fue cargada con frutillas para simular los tratamientos y evaluar cuánto ozono consumía la materia orgánica que contenían inicialmente las muestras, y cuál era la concentración de ozono residual.

3.3.1.4 *Condiciones de ozonización de frutillas y tiempos de exposición*

Para los tratamientos con ozono, la columna de burbujeo se cargó con 1,25 L de agua destilada y 10 frutillas (aproximadamente 200 g). Los tiempos de exposición evaluados fueron: 0 (control sin tratar), 5, 10 y 15 min, seleccionados en función de la bibliografía existente y de pruebas preliminares en laboratorio.

El tratamiento descrito involucra dos factores que contribuirían a la descontaminación microbiana de los frutos: uno es el posible efecto del ozono y otro es el lavado mecánico que se produce durante el burbujeo y agitación de los frutos en la columna.

Con el fin de individualizar cada uno de estos efectos involucrados en el tratamiento, para los estudios microbiológicos se realizaron una serie de controles adicionales, que consistieron en frutos sometidos a los mismos tiempos de exposición que en los tratamientos de ozonización (5, 10 y 15 min) y con el mismo caudal de oxígeno en la alimentación de la columna, pero manteniendo el generador de ozono apagado. De esta manera, se aisló el efecto de lavado mecánico que se produce en la columna ocasionado en estos casos por el gas de alimentación. Posteriormente los frutos fueron secados haciéndolos rodar sobre papel absorbente.

En resumen, para la evaluación del efecto de los tratamientos con ozono sobre la microbiota nativa y *Botrytis cinerea*, se utilizaron dos tipos de controles:

- Frutos que no fueron sometidos a ningún tratamiento más allá del almacenamiento (**Control**).
- Frutos sometidos a iguales tiempos de exposición utilizando igual caudal de gas pero con el generador apagado, que se denominaron controles de lavado (**CL**) y cuya abreviación de aquí en más es: **CL-5 min**, **CL-10 min** y **CL-15 min**.

Para los restantes tratamientos y determinaciones evaluadas, se consideraron como **Control** a aquellos frutos que no recibieron ningún tratamiento más allá del almacenamiento.

3.3.2 Tratamiento con luz pulsada

3.3.2.1 Descripción del equipo

Se utilizó un equipo de luz pulsada Xenon Steripulse-XL modelo RS-3000B (Xenon Corporation, Estados Unidos) que emitía pulsos de luz de alta intensidad en un rango de longitudes de onda desde 200 a 1100 nm. El sistema consistía en un módulo controlador RC-747, una cámara de tratamiento que contenía la lámpara de Xenon y un sistema de ventilación forzada de aire filtrado que evitaba el recalentamiento de la lámpara durante su funcionamiento. El equipo generaba 3 pulsos de alta intensidad por segundo de 360 μ s de amplitud cada uno. De acuerdo a los datos especificados por el fabricante, la fluencia emitida por cada pulso, medida a una distancia de 1,9 cm desde la ventana de cuarzo que cubre la lámpara, era de 1,27 J.cm⁻². Diferentes fluencias pueden obtenerse al modificar la cantidad de pulsos aplicados y la distancia a la lámpara a la cual se ubican las muestras (**Figura 3.4**).

La cabina de tratamiento estaba construida en acero inoxidable; sus dimensiones eran 40 cm de alto x 76,2 cm de largo x 20 cm de ancho, con un estante móvil para poder ubicar las muestras a diferentes distancias de la lámpara. Para las experiencias, el estante se posicionó a 10 cm de la ventana de la lámpara. Como la luz no incidía de manera homogénea sobre todo el estante, para asegurarse que la irradiación de las muestras en los tratamientos fuera uniforme, las placas fueron ubicadas siempre en la región central del estante y a una distancia no mayor de 10 cm del punto central de la lámpara (Gómez y col., 2012).

3.3.2.2 *Tratamiento de las muestras*

Para los tratamientos con luz pulsada se colocaron 4 frutillas en una caja de Petri (9 cm de diámetro), previamente esterilizada con alcohol. Se irradiaron dos cajas de Petri en simultáneo, que se colocaron en la región central del estante a no más de 10 cm del punto central de la lámpara (**Figura 3.5**). Posteriormente, los frutos fueron volteados y colocados en dos nuevas cajas de Petri esterilizadas, e irradiadas por el mismo período de tiempo, de manera que recibieran la misma dosis en ambos lados. Se evaluaron dos tiempos de tratamiento, 10 y 20 segundos, basándose en resultados previos obtenidos por Duarte-Molina y col. (2016), que corresponden a fluencias de 11,9 y 23,9 J.cm⁻², respectivamente. Además, en dicho estudio reportaron el incremento de la temperatura registrado en dos posiciones (cerca de la superficie y en el centro del fruto). En el centro la temperatura alcanzada fue de 14,2 ± 0,4 °C y de 15,1 ± 0,5 °C, luego de 10 y 20 s de irradiación, y en la superficie de 20,7 ± 2,0 °C y 29,3 ± 2,3 °C, respectivamente.

3.3.3 **Tratamiento térmico**

3.3.3.1 *Descripción del tratamiento*

Los tratamientos térmicos consistieron en la inmersión de 10 frutillas (aproximadamente 200 g) en un vaso de precipitado de 2 L de capacidad que contenía 1,25 L de agua destilada, que inicialmente se encontraba a 46,3 ± 0,4 °C. El vaso de precipitado estaba colocado sobre un agitador orbital para favorecer la transferencia de calor y simular las condiciones de agitación durante un lavado mecánico (**Figura 3.6**). Se evaluaron dos tiempos de tratamiento: 2,5 y 5,0 min. Posteriormente los frutos fueron secados haciéndolos rodar sobre papel absorbente.



Figura 3.4. Equipo de luz pulsada.

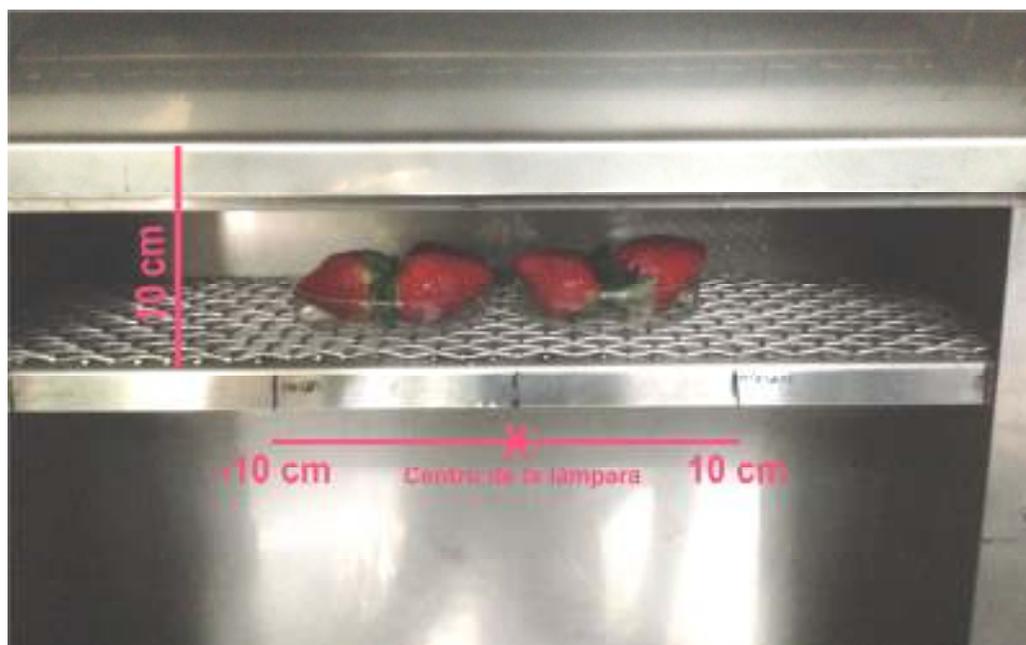


Figura 3.5. Disposición de las muestras en la cabina de luz pulsada.

3.3.3.2 *Determinación de los perfiles de temperatura*

Se analizó la evolución de la temperatura tanto en el agua como en las frutillas. En el caso de los frutos (de 3,5 a 4,0 cm de diámetro mayor), la temperatura se registró en dos posiciones, a 1 y a 5 mm desde la superficie en contacto con el agua.



Figura 3.6. Tratamiento térmico de frutillas.

Para las determinaciones se utilizaron termocuplas tipo T (Cu-constatán) y un registrador de temperatura de 12 canales Digi-Sense modelo 69202-30 (Barnant Company Division, Estados Unidos). La determinación de los perfiles de temperatura se realizó por triplicado.

3.4 Tratamientos combinados

3.4.1 Combinación ozono-luz pulsada

En función de los resultados correspondientes al tratamiento con ozono en fase acuosa, se seleccionó un tiempo de tratamiento de 5 min para analizar las combinaciones con dos dosis de pulsos, 11,9 y 23,9 J.cm⁻². Se ensayaron ambas secuencias, ozono seguido de luz pulsada y viceversa.

3.4.2 Combinación tratamiento térmico moderado-luz pulsada

En función de los resultados de la combinación ozono-luz pulsada se decidió combinar sólo una dosis de pulsos, de 11,9 J.cm⁻², con ambos tiempos de tratamiento térmico, y en la secuencia tratamiento térmico seguida de pulsos.

3.5 Almacenamiento de las muestras

Las muestras fueron empacadas en grupos de 10 en bandejas con tapa de polipropileno permeables al aire, que constaban con divisorios plásticos (**Figura 3.7**) de manera de evitar el golpe, contacto y desorden entre los frutos al transportar las bandejas. Las muestras fueron almacenadas a 5 ± 1 °C durante 12 días.

Para las determinaciones de propiedades fisicoquímicas, contenido de antocianinas y compuestos fenólicos, y capacidad antioxidante, se tomaron muestras a los 0, 4, 8 y 12 días de almacenamiento. Las muestras fueron cortadas longitudinalmente en mitades, de manera de obtener dos porciones de no menos de 10 g cada una. Una de esas mitades se destinaría a la determinación de propiedades fisicoquímicas, y la otra a compuestos bioactivos y capacidad antioxidante. Las mitades así recolectadas fueron almacenadas en un ultrafreezer modelo MDF-U55V (Panasonic, Japón) a -80 °C hasta el momento de realizar las determinaciones, lapso que no superó los 30 días.

3.6 Estudios microbiológicos

3.6.1 Evolución de la micoflora nativa de frutillas

La evolución de la micoflora nativa fue analizada mediante inspección visual sobre dos replicados de 20 frutos cada uno, para cada condición evaluada. Los frutos fueron inspeccionados a diario y en caso de presentar infección fueron contabilizados y eliminados de las bandejas. Se consideraron frutos infectados a aquellos que presentaron desarrollo fúngico a nivel superficial, sin importar el grado de severidad del mismo (**Figura 3.8**).

Los resultados se expresaron como porcentaje de frutos infectados (**%FI**) referidos a la cantidad inicial de cada réplica (**Ecuación 3.2**).

$$\% \text{ FI} = \frac{\text{NI}_t}{\text{N}_0} \times 100 \quad (\text{Ec. 3.2})$$

donde, NI_t : es la cantidad de frutos infectados al tiempo t , N_0 : cantidad de frutos al día 0 por réplica.



Figura 3.7. Empaque y almacenamiento de frutillas.



Figura 3.8. Ejemplos de frutos considerados infectados durante el almacenamiento.

3.6.2 Evolución de *Botrytis cinerea* inoculado en frutillas

3.6.2.1 Preparación de la suspensión de conidios

Se utilizó la cepa *Botrytis cinerea* BAFC 3003 provista por la Colección de Cultivos BAFC (Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires). El cultivo de la cepa fúngica se realizó en agar extracto de malta (MEA) previamente esterilizado a 121 °C durante 15 min. Se llenaron tubos con 10 mL de MEA y una vez que alcanzaron temperatura ambiente, fueron sembrados con la cepa y posteriormente almacenados a 25 °C durante 14 días. Los conidios producidos se cosecharon mediante el lavado de cada tubo con 5 mL de agua peptonada estéril 0,1% (p/v) + Tween 80 0,05% (v/v) y posterior agitación en vortex. La concentración de la suspensión obtenida ($\sim 10^4$ conidios.mL⁻¹) se determinó utilizando una cámara Neubauer (Exacta, Alemania).

3.6.2.2 *Inoculación de las frutillas*

Previo a la inoculación, los frutos fueron inmersos en una solución de hipoclorito de sodio (200 mg.L^{-1}) durante 2 min y enjuagados tres veces con agua destilada, con el fin de reducir la microbiota nativa y demás materia orgánica que pudiera contener la superficie de las frutillas. Se utilizó un método de inoculación por puntos, que consistió en realizar dos pequeñas heridas superficiales en la piel de las frutillas, aproximadamente a mitad de distancia entre el cáliz y la zona ecuatorial. En cada herida se colocó un volumen de $10 \mu\text{l}$ de suspensión de conidios ($20 \mu\text{l}$ totales en cada frutilla) y posteriormente se los dejó secar dentro de una cabina de flujo laminar (modelo FVL 750, Sabella, Argentina) durante 2 horas para favorecer la fijación del inóculo (**Figura 3.9**). Las bandejas con las frutillas inoculadas fueron almacenadas a $20 \pm 3 \text{ }^\circ\text{C}$ durante la noche antes de ser tratadas a primera hora del día siguiente. Los resultados de inoculación fueron expresados como porcentaje de frutos infectados (% FI), calculado según la ecuación 3.2 descripta en el ensayo de flora nativa.

Todos los controles utilizados en este estudio fueron sometidos al proceso de inoculación, independientemente del tratamiento posterior.

Tal como se indicó en la **Sección 3.3.1.4**, para el estudio del efecto del ozono sobre *Botrytis cinerea* se utilizaron dos grupos de controles, inoculados y almacenados (**Control**), ó inoculados e inmersos en agua destilada burbujeada con el gas de alimentación con el generador apagado durante los mismos tiempos de exposición al ozono (controles de lavado, **CL-5 min**, **CL-10 min**, **CL-15 min**). Se realizaron 3 réplicas de 10 frutos cada una para cada condición.

3.7 **Medición instrumental del color**

Para la evaluación del color superficial de las muestras control y tratadas con ozono, se utilizó un espectrofotómetro triestímulo de reflectancia con esfera integradora modelo CM-508-d (Minolta Co, Japón), usando una apertura de 1,1 cm de diámetro, iluminante D65 y 2° de ángulo de observación.

Debido al daño del equipo mencionado, para la medición del color de las muestras sometidas a la combinación de tratamiento térmico y luz pulsada, se utilizó un espectrofotómetro triestímulo de reflectancia con esfera integradora modelo CM-700-d (Minolta Co, Japón), con una apertura de 5 mm, iluminante D65 y 2° de ángulo de observación.



Figura 3.9. Frutillas inoculadas dentro de la cabina de flujo laminar.

En todos los casos mencionados se registraron las coordenadas de color del espacio CIE (X , Y , Z) y los componentes L^* , a^* , b^* del espacio CIELAB, donde L^* indica luminosidad, a^* indica cromaticidad sobre un eje que va desde el verde (-) al rojo (+), y b^* cromaticidad sobre un eje que va desde el azul (-) al amarillo (+). A partir de estos valores numéricos se calcularon las funciones de color "croma" (C^*) y "ángulo de tono" (h) mediante las **Ecuaciones 3.3** y **3.4**, respectivamente.

$$C^* = \left(a^{*2} + b^{*2} \right)^{\frac{1}{2}} \quad (\text{Ec. 3.3})$$

$$h = \arctg \left(\frac{b^*}{a^*} \right) \quad (\text{Ec. 3.4})$$

El color superficial de los frutos tratados y control fue evaluado sobre 30 replicados para cada condición a los 0, 4, 8 y 12 días de almacenamiento. Las mediciones se realizaron en dos puntos diferentes de la zona ecuatorial del fruto, que luego se promediaron.

3.8 Determinación de la pérdida de peso

La pérdida de peso de los frutos tratados y control fue evaluada a lo largo del almacenamiento. El peso de las muestras fue registrado en una balanza modelo 180 A (Precisa, Suiza) con una precisión de $\pm 0,0001$ g. Los frutos fueron pesados a los 0 (inmediatamente después de realizados los tratamientos), y a los 4, 8 y 12 días de almacenamiento. Los resultados fueron expresados como porcentaje de variación de peso con respecto al peso registrado al día 0, según se indica en la **Ecuación 3.5**.

$$\% \text{ pérdida de peso (\%PP)} = \frac{(P_0 - P_t)}{P_0} \times 100 \quad (\text{Ec. 3.5})$$

donde: P_0 es el peso inicial de cada fruto tratado o control al día 0 del almacenamiento y P_t es el peso del fruto tratado o control a un tiempo t del almacenamiento.

3.9 Medición de las propiedades mecánicas

La evaluación de las propiedades mecánicas a altas deformaciones se realizó mediante un ensayo de punción en una Máquina de Ensayos Universales modelo 3345 (Instron, Estados Unidos), utilizando una celda de carga de 50 N conectada al software de adquisición de datos Bluehill 2 versión 2.17 (Instron, Estados Unidos). Los frutos fueron penetrados en la zona ecuatorial y completamente atravesados por un punzón de acero inoxidable de punta plana de 4,8 mm de diámetro (**Figura 3.10**). Se utilizó una velocidad del cabezal constante e igual a 30 mm/min. Se registraron las curvas fuerza (N) - desplazamiento (mm) y, teniendo en cuenta el área del punzón y el diámetro ecuatorial de cada fruto, se registró también la curva esfuerzo (mPa) - deformación (%). De estas dos curvas se determinaron los siguientes parámetros:

Curva fuerza (N) - desplazamiento (mm):

- Fuerza máxima de ruptura (F_R): es la fuerza máxima (N) que se registra al producirse la ruptura de la epidermis.
- Deformación al punto de ruptura (D): es el porcentaje de deformación correspondiente a F_R . Se calcula como el cociente entre el valor de desplazamiento (mm) correspondiente a F_R y el diámetro ecuatorial del fruto (mm).



Figura 3.10.Ensayo de punción de frutillas.

- Trabajo (W): representa la energía necesaria para romper la epidermis. Se calcula como el área encerrada bajo la curva fuerza - desplazamiento, desde que el punzón entra en contacto con la fruta hasta F_R .

Curva esfuerzo (mPa) - deformación (%):

- Módulo de deformabilidad (E_d): representa la elasticidad que presenta el fruto al ser penetrado por el punzón. Se calcula como la pendiente en la parte lineal inicial de la curva.

En la **Figura 3.11** se presentan las curvas fuerza - desplazamiento y esfuerzo - deformación, y los parámetros obtenidos de las mismas.

Se utilizaron 40 frutos por tratamiento que fueron medidos a los 0 (aproximadamente 2 horas después de realizado el tratamiento), 4, 8 y 12 días de almacenamiento. En el caso de muestras almacenadas, las 4 bandejas correspondientes a cada tratamiento fueron retiradas de la heladera y se midieron cuando habían alcanzado temperatura ambiente (aproximadamente 25 °C).

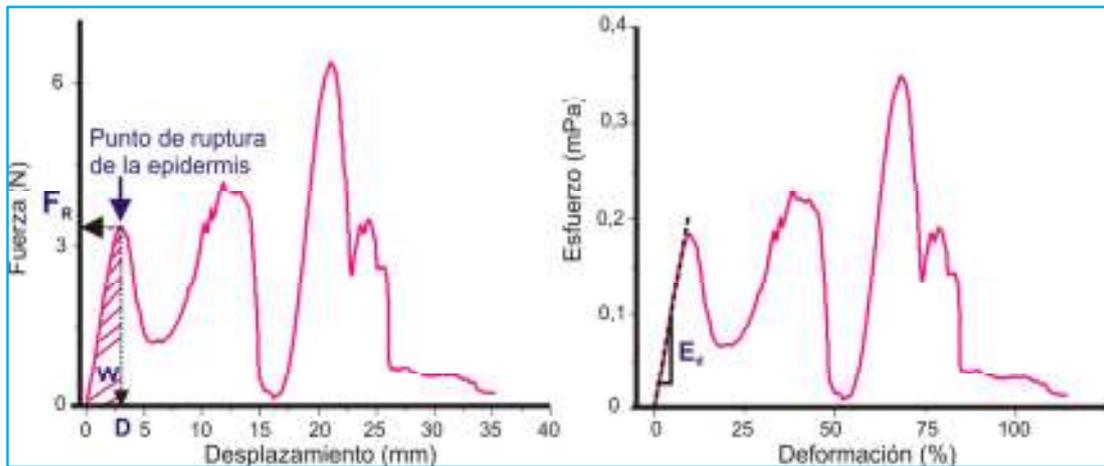


Figura 3.11. Ensayo de punción de frutillas.

3.10 Observación de la estructura

Las muestras de frutillas tratadas y control destinadas a la evaluación microscópica (tres frutos por cada condición) se cortaron con una hoja de afeitar en gajos longitudinales de ~ 3 mm de espesor que contenían tejido epidérmico y subepidérmico, como se esquematiza en la **Figura 3.12**.

3.10.1 Microscopía óptica (MO)

Las secciones longitudinales de las frutillas control y tratadas fueron fijadas en una solución de glutaraldehído al 3% (v/v) preparada en buffer fosfato de potasio 20 mM, pH 7,4 a 4-5 °C durante 48 h. Luego fueron lavadas con solución buffer fosfato de potasio 0,1 M, pH 7,4, y nuevamente fijadas en solución acuosa de OsO_4 1,5% (p/v) a 20 °C durante 2 h. Posteriormente fueron deshidratadas con una serie de soluciones sucesivas de concentración ascendente de acetona, y finalmente embebidas en resina Spurr de baja viscosidad. A partir de las muestras incluidas en resina Spurr se obtuvieron secciones de 1 μm de espesor que fueron teñidas con azul de toluidina y examinadas en un microscopio Zeiss Axioscop 2 (Carl Zeiss AG, Alemania). Las imágenes fueron tomadas con una cámara Cannon EOS 1000 D (Cannon, Japón) y analizadas con el programa Axio Vision 4.8.2 (Carl Zeiss, Alemania).

3.10.2 Microscopía electrónica de transmisión (MET)

Para las observaciones en el microscopio electrónico de transmisión, las muestras incluidas en resina Spurr se cortaron en secciones ultrafinas con una cuchilla de diamante utilizando un ultramicrotomo Sorvall MT2B (Ultracut, Estados Unidos) y se

montaron en grillas de cobre. Luego se colorearon con una solución al 5% (p/p) de acetato de uranilo durante 45 min y, posteriormente, con citrato de sodio y nitrato de plomo (solución de Reynolds). Los preparados fueron analizados con un microscopio electrónico de transmisión JOEL JEM-1200 EX II (Japón) utilizando un voltaje de aceleración de 80 kV.

3.11 Evaluación de parámetros fisicoquímicos

Los parámetros fisicoquímicos fueron evaluados tanto en frutos control como tratados a los 0, 4, 8 y 12 días de almacenamiento. Se utilizaron las muestras previamente almacenadas en ultrafreezer. Se tomaron tres mitades (aproximadamente 30 g) que fueron trituradas hasta obtener una pulpa homogénea utilizando un mortero de vidrio. Para cada tratamiento y día de almacenamiento se obtuvieron tres pulpas (triplicados), a las cuales se le realizaron las determinaciones que se enumeran a continuación.

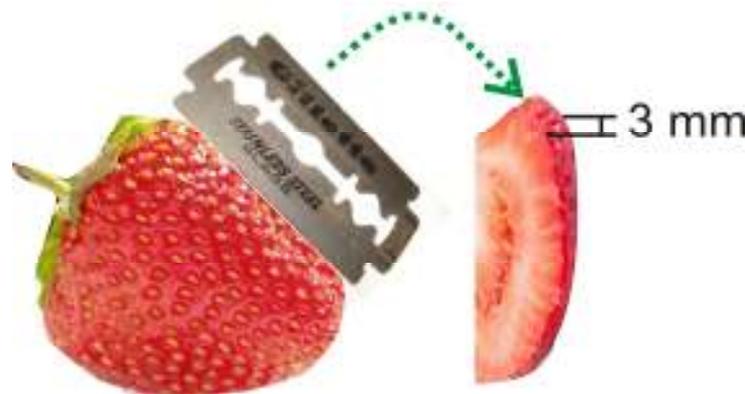


Figura 3.12. Corte longitudinal para toma de muestra para observaciones microscópicas.

3.11.1 Determinación del pH

Para la determinación del pH se utilizó un pHmetro PerpHectLogRmeter modelo 310 (Orion, Estados Unidos). El mismo fue calibrado con soluciones buffer de pH 7,0 y pH 4,0 antes de realizar la medición.

3.11.2 Contenido de sólidos solubles

La determinación de sólidos solubles fue realizada con un refractómetro digital modelo PR-101 (Atago, Japón), previamente calibrado con agua destilada. Los resultados fueron expresados en °Brix (g de sacarosa/100 g de pulpa de fruta).

3.11.3 Acidez titulable

La acidez titulable fue determinada por el método de titulación potenciométrico (AOAC, 2005). Se tomaron 5 g de la pulpa de frutillas a la cual se le agregaron 50 mL de agua destilada previamente calentada a 80 °C. Se mezcló y se dejó reposar 30 minutos. Luego se filtró de manera de eliminar la pulpa utilizando papel de filtro Whatman (#1). El filtrado fue titulado con solución 0,1 N de hidróxido de sodio (NaOH) hasta alcanzar un pH final de $8,2 \pm 0,1$. Los resultados fueron expresados como % (p/p) de ácido cítrico presentes en 100 g de fruta, calculados según la **Ecuación 3.6**.

$$\% \text{ ácido cítrico (p/p)} = \frac{V_{\text{NaOH}} \times N_{\text{NaOH}} \times PE_{\text{ácido cítrico}}}{P_m} \times 100 \quad (\text{Ec. 3.6})$$

donde: V_{NaOH} es el volumen gastado en la titulación (L), N_{NaOH} es la normalidad de la solución titulante, $PE_{\text{ácido cítrico}}$ es el peso equivalente del ácido cítrico (64 g.eq^{-1}), y P_m es la masa de pulpa utilizada.

3.11.4 Contenido de humedad

La humedad fue medida por el método gravimétrico. Se tomó una alícuota de aproximadamente 3 g de pulpa de frutillas, se colocó en pesafiltros y se secó en una estufa de secado a vacío Gallenkamp (Sanyo, Reino Unido) a 65 °C, utilizando cloruro de calcio como material absorbente. Las muestras fueron pesadas periódicamente hasta que la variación en el peso fue menor a 0,0001 g. Los resultados fueron expresados como porcentaje de agua contenida en 100 g de fruta (base húmeda).

3.12 Extracción y determinación de compuestos bioactivos y capacidad antioxidante

Para la extracción de los diferentes compuestos evaluados, se tomó como punto de partida el conocimiento previo del grupo (Escobar-Tobar, 2017) y se buscaron nuevas alternativas que conllevaran a la utilización de un mismo extracto para todas las determinaciones, un mayor rendimiento en la extracción y mayor rapidez en la obtención de los extractos. En este sentido, se hicieron pruebas de extracción asistida con ultrasonido modificando tres variables:

- Relación volumen de solvente (L) / masa de fruta (g): 0,005 - 0,0075 - 0,01
- Amplitud del ultrasonido (%): 20 - 40 - 60
- Tiempo de sonicación (min): 5 - 10 - 15

Se utilizó un diseño de superficies de respuesta para obtener las condiciones de operación óptimas que logran maximizar el rendimiento en antocianinas, compuestos fenólicos y capacidad antioxidante (medida con la técnica de ABTS). Como resultado de esta optimización se obtuvieron las condiciones que se resumen a continuación, que fueron las utilizadas para la extracción de compuestos bioactivos a lo largo de la tesis.

3.12.1 Extracción de compuestos bioactivos

Para la obtención de los extractos se tomó cada mitad de frutilla almacenada en el ultrafreezer, se la trituró en un mortero de vidrio hasta obtener una pulpa homogénea. Luego se pesaron 10 gramos y se agregaron 80 mL de mezcla extractora. La mezcla extractora utilizada contenía alcohol etílico y ácido clorhídrico (0,1N) en una proporción del 85:15 (v/v), respectivamente. Se maceró la pulpa con el solvente durante unos minutos y se colocó en un vaso doble camisa de 150 mL de capacidad (7 cm de diámetro exterior y 10 cm de alto) para someterlo a sonicación. El vaso fue conectado a un baño termostático modelo Rotovisco RV12 (HAAKE, Alemania). Se ajustó la temperatura del mismo a 12 ± 2 °C de manera que la temperatura del extracto alcanzara los 30 ± 1 °C dentro de los primeros 3 minutos de sonicación, y permaneciera constante hasta cumplir el tiempo de extracción. Se utilizó un equipo de ultrasonido Vibracell VCX-600 (Sonic Materials Inc, Estados Unidos) de alta intensidad y baja frecuencia (20 kHz, 600 Watts, 119 μ m de amplitud de onda). Las condiciones de sonicación utilizadas fueron: 60% de amplitud de onda (71,4 μ m) durante 15 minutos manteniendo la temperatura a 30 °C. Finalmente, los extractos fueron filtrados a vacío con papel Whatman (#1) y se fraccionaron en 4 frascos de vidrio ámbar de 10 mL de capacidad. Uno de los frascos fue destinado a la determinación de antocianinas, otro a compuestos fenólicos, y los dos restantes a capacidad antioxidante, que fue medida por dos métodos diferentes. Los extractos fueron almacenados en ultrafreezer a -80 °C hasta el momento de realizar las determinaciones. Se realizaron 5 extractos por cada tratamiento y día de almacenamiento.

3.12.2 Determinación del contenido de antocianinas monoméricas totales

El contenido de antocianinas monoméricas totales (AT) fue determinado mediante la técnica de pH diferencial descrita por Giusti y Wrolstad (2001). Los extractos fueron diluidos en frascos ámbar en una proporción 1:10 (v/v) en solución buffer de cloruro de potasio (0,025 M, pH 1,0) y en solución buffer de acetato de sodio (0,4 M, pH 4,5) y luego fueron agitados en un vortex ZX-classic (VELP, Europa). Las muestras

se dejaron estabilizar durante 15 min a temperatura ambiente y posteriormente se determinó la absorbancia de las mismas a dos longitudes de onda, 510 y 700 nm, mediante un espectrofotómetro UV-VIS modelo V-630 (Jasco, Japón). El contenido de antocianinas en las muestras se determinó mediante la **Ecuación 3.7**. Los resultados fueron expresados como miligramos de pelargonidina 3-glucósido (antocianina mayoritaria en frutillas) por cada 100 gramos de fruta (base seca). Cada extracto se midió por triplicado.

$$AT = \frac{[(A_{510}-A_{700})_{pH=1}-(A_{510}-A_{700})_{pH=4,5}] \times PM_{pg3} \times FD \times 100}{\epsilon \times l} \quad (\text{Ec. 3.7})$$

donde, A: es la absorbancia de las muestras, PM_{pg3} : es el peso molecular de pelargonidina 3-glucósido (433 g mol^{-1}), FD: es el factor de dilución de las muestras (10), ϵ : es el coeficiente de absortividad molar ($22400 \text{ l mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) (Odrizola-Serrano y col., 2009), l: paso óptico de la celda (1 cm).

3.12.3 Determinación de compuestos fenólicos totales

El contenido de compuestos fenólicos totales (**FT**) se determinó por el método colorimétrico de Folin-Ciocalteu utilizando la técnica modificada por Slinkard y col. (1977). En frascos de vidrio ámbar (5 mL) se colocaron 0,2 mL de extracto diluido (1:2,5) con 2,6 mL de agua bidestilada y 0,2 mL de reactivo Folin-Ciocalteu (FCR). Los frascos fueron agitados en un vortex ZX-classic (VELP, Europa) y se dejaron reposar 6 minutos. Luego se agregaron 2 mL de solución de carbonato de sodio 7% (p/v), se agitó nuevamente en vortex y se dejó reposar durante 90 minutos a temperatura ambiente y al resguardo de la luz. Finalmente se determinó la absorbancia de las muestras a 760 nm mediante un espectrofotómetro UV-VIS modelo V-630 (Jasco, Japón). Cada extracto se midió por duplicado. El contenido de fenoles totales se expresó en mg equivalentes de ácido gálico presentes en 100 gramos de fruta (base seca) (mg EAG/100g b.s.). La curva de calibración con ácido gálico se construyó a partir de 8 concentraciones diferentes en el rango de 1 - 8 mg AG.L⁻¹.

3.12.4 Determinación de capacidad antioxidante (CA)

Se utilizaron dos métodos diferentes para la determinación de la capacidad antioxidante: **TEAC** (Capacidad Antioxidante como Equivalentes de Trolox) y **ORAC** (Capacidad de Absorción de Radicales de Oxígeno).

3.12.4.1 *Ensayo TEAC*

La determinación de CA mediante el método de **TEAC** se realizó de acuerdo a la metodología descrita por Re y col. (1999) con ligeras modificaciones.

Para la generación del radical $ABTS^{\cdot+}$ se disolvieron 0,019 g de ABTS en 5 mL de una solución de persulfato de potasio (2,28 mM) y se incubó en oscuridad a temperatura ambiente ($\pm 25^{\circ}C$) durante 16 horas. Transcurrido ese lapso, se diluyó (1:50) (v/v) en buffer fosfato pH 7,4 hasta obtener una absorbancia de $1,00 \pm 0,01$ a 734 nm. En frascos de vidrio ámbar (10 mL) se colocaron 80 μ L del extracto diluido (1/5) (v/v) con 7,92 mL de la solución de radical $ABTS^{\cdot+}$. Se agitó en vortex y se incubó durante 2 h a $30^{\circ}C$ en un baño termostático modelo Masson (Vicking, Argentina). Finalmente se registró el decrecimiento en la intensidad de absorción del catión $ABTS^{\cdot+}$ debido a la interacción con compuestos donantes de hidrógeno o de electrones, midiendo la absorbancia a 734 nm en un espectrofotómetro UV-VIS modelo V-630 (Jasco, Japón). El blanco consistió en 80 μ l de buffer fosfato pH 7,4 y 7,92 ml del radical $ABTS^{\cdot+}$. La CA se obtuvo mediante la comparación con curvas de calibración realizadas con Trolox. La curva de calibración se construyó a partir de 12 concentraciones diferentes en el rango de 6 - 17 μ M Trolox. El tiempo de incubación para las soluciones de Trolox fue de 30 minutos. Cabe destacarse que los diferentes tiempos de incubación utilizados para las soluciones de Trolox y las muestras surgieron del estudio de la cinética de reacción del radical con el patrón y los extractos respectivamente.

El grado de decoloración del radical por efecto de los estándares y de los anti-oxidantes presentes en las muestras se calculó como porcentaje de inhibición (% I) de acuerdo a las **Ecuaciones 3.9** y **3.10**, respectivamente. Para determinar el porcentaje de inhibición (% I_{Bco}) del blanco (**Ecuación 3.8**) se tomó la medida de la absorbancia luego de un minuto (1 min) de reacción y luego de 30 min de incubación, en el caso del blanco utilizado para los estándares, y 2 h para el blanco utilizado para las muestras.

$$\% I_{Bco} = \frac{[A_{Bco\ 1min} - A_t]}{A_{Bco\ 1min}} \quad (\text{Ec. 3.8})$$

$$\% I_{patrón} = \frac{[A_{Bco\ 1min} - A_{patrón, 30min}] \times 100}{A_{Blanco-1min}} - \% I_{Bco} \quad (\text{Ec. 3.9})$$

$$\% I_{muestra} = \frac{[A_{Bco\ 1min} - A_{muestra, 2h}] \times 100}{A_{Blanco-1min}} - \% I_{Bco} \quad (\text{Ec. 3.10})$$

donde, $A_{\text{Bco } 1\text{min}}$ es la absorbancia del blanco al minuto 1 de incubación, A_t es la absorbancia del blanco luego de 30 minutos o 2 horas de incubación, $A_{\text{patrón, } 30 \text{ min}}$ es la absorbancia del patrón luego de 30 minutos de incubación, $A_{\text{muestra, } 2\text{h}}$ es la absorbancia de la muestra luego de 2 horas de incubación.

Los resultados se expresaron como mM equivalentes de Trolox presentes en 100 g de fruta (base seca) (mM Trolox/100g b.s.). Para cada extracto las mediciones se realizaron por duplicado.

3.12.4.2 *Ensayo ORAC*

La determinación de la CA por el método de ORAC se realizó de acuerdo a la técnica descrita para la determinación de antioxidantes hidrofílicos (Ou y col. 2001, Huang y col. 2002) adaptada por Dávalos y col. (2004). La técnica convencional de ORAC ha sido validada utilizando sistemas automáticos. Dávalos y col. (2004) proponen una adaptación de la técnica para sistemas manuales, modificando las concentraciones de los reactivos, y por lo tanto, los volúmenes a manipular al llevar a cabo la reacción.

Este método utiliza la fluoresceína como sonda fluorescente. Los extractos fueron diluidos en solución buffer de fosfato de potasio (75 mM, pH 7,4) hasta concentraciones 1:160 (v/v) y 1:240 (v/v). La evolución de la fluorescencia durante el tiempo fue medida mediante un luminómetro Victor Multilabel 1420 (Perkin Elmer, Estados Unidos) sobre microplacas de poliestireno negras de 96 pocillos, de fondo plano y superficie sin tratamiento (Corning, Estados Unidos). En cada pocillo se colocaron 115 μl de fluoresceína ($8,16 \times 10^{-5}$ mM) y 25 μl del extracto diluido. La mezcla se incubó con agitación a 37 °C durante 10 min. Posteriormente se adicionaron 60 μl de solución de AAPH (153 mM), se agitó la placa durante 1 min y se comenzó inmediatamente con la medición manteniendo la temperatura fija en 37 °C. Las lecturas de fluorescencia en cada pocillo fueron registradas cada 40 s hasta cumplir un tiempo total de 66 min, utilizando filtros de emisión y excitación de 520 y 485 nm, respectivamente. El blanco consistió en utilizar 25 μl de solución buffer de fosfato de potasio (75 mM, pH 7,4) en lugar del extracto. Los resultados se expresaron como mM equivalentes de Trolox presentes en 100 g de fruta (base seca) (mM Trolox/100g b.s.). La curva de calibración se construyó a partir de 6 concentraciones diferentes en el rango de 3,125 - 50 μM . Los diferentes extractos y las soluciones de Trolox se midieron por duplicado.

Se calcularon los valores del área bajo la curva de fluorescencia (**ABC**) obtenida para el blanco, los estándares y los extractos utilizando el programa Origin 8 SRO v8.0724 (OriginLab Corp., Estados Unidos). A cada ABC de los estándares y de los extractos, se le sustrajo el valor de ABC del blanco, obteniendo así el área bajo la curva neta (**ABC_{neto}**), según se indica en la **Figura 3.13**. La curva de calibración se construyó con los pares de datos de concentración y **ABC_{neto}** correspondiente. Los valores finales de ORAC se determinaron a partir de los valores de **ABC_{neto}** de cada extracto y la regresión de la curva de calibración.

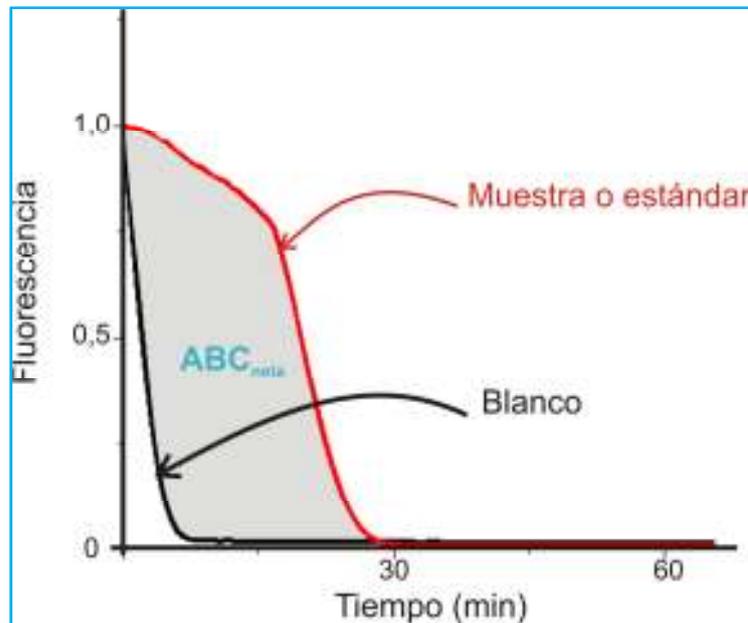


Figura 3.13. Determinación del área bajo la curva de fluorescencia neta.

3.13 Análisis Sensorial

El análisis sensorial realizado tuvo como objetivo evaluar la capacidad de los consumidores para encontrar diferencias entre las muestras sin tratamiento (control) y las muestras ozonizadas por 5 min, a los 1 y 3 días de almacenamiento. Este tratamiento fue elegido en función de los resultados de los parámetros de calidad evaluados en la tesis.

El ensayo realizado fue el de diferencia contra control. En cada sesión los jueces recibieron dos muestras, presentadas de manera idéntica en todas sus propiedades y codificadas con claves de tres cifras, y un control identificado como tal (**C**) (**Figura 3.14**). Una de las muestras correspondía a frutillas tratadas con ozono mientras que la otra era

un control camuflado. Las muestras se sirvieron a temperatura de consumo (entre 22-25 °C). El orden de presentación fue al azar pero balanceado. La distribución de los distintos conjuntos de muestras entre los sujetos también fue al azar.

Se les pidió a los consumidores que evaluaran la magnitud de la diferencia entre las muestras presentadas y el control reconocido como tal, y que lo marcaran en una escala numérica de categorías desde "ninguna" a "muy grande", como se esquematiza en el **Formulario N°1**. Se solicitó además, especificar el aspecto representativo de esas diferencias, en caso de ser posible.

3.13.1 Área de prueba

Se seleccionó una habitación con luz natural, temperatura agradable y libre de posibles distracciones. Para que los juicios fuesen independientes, el sector de análisis fue dividido en seis cubículos blancos (**Figura 3.15**). Cada uno de ellos fue provisto con un vaso de agua, una servilleta y la planilla correspondiente (**Figura 3.14**). La preparación de las muestras fue realizada en el sector del comedor del Departamento de Industrias que cuenta con mesada y mesas para poder lavar y presentar los frutos antes de ser entregados a los consumidores.

3.13.2 Jueces

Para cada tiempo de almacenamiento evaluado, se reclutaron 60 personas cuyas edades se encontraba en el rango de los 20 a 60 años, entre ellos estudiantes universitarios, no docentes y docentes del Departamento de Industrias. Al finalizar la prueba se les proporcionó una pequeña recompensa, consistente en una golosina, en agradecimiento por su cooperación.

En la **Figura 3.16** se resumen las determinaciones realizadas para cada tratamiento estudiado a lo largo de la tesis y el correspondiente lote utilizado.



Figura 3.14. Disposición de las muestras y material entregado a los consumidores.



Figura 3.15. Sala de evaluación sensorial.

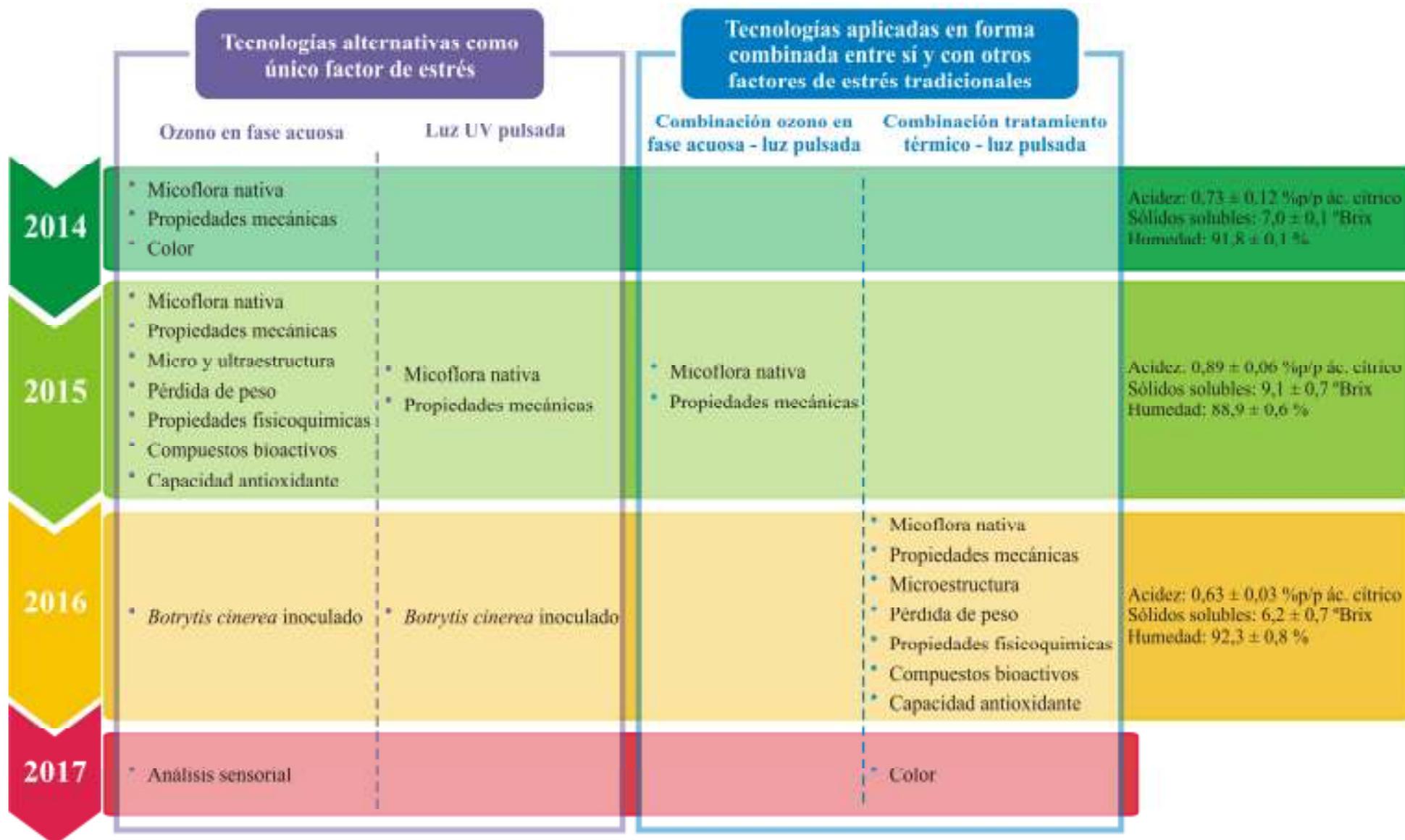


Figura 3.16. Esquema de los ensayos realizados en los distintos tratamientos estudiados a lo largo de la tesis y lote utilizado en cada uno de ellos.

3.14 Análisis estadístico

Los resultados fueron expresados como la media \pm desviación estándar y fueron analizados mediante los programas estadísticos Infostat v.2008 (Universidad Nacional de Córdoba, Argentina) y SPSS v.19 (SPSS Inc., Estados Unidos).

Las propiedades fisicoquímicas (contenido de sólidos solubles, pH, acidez titulable, humedad), contenido de antocianinas, compuestos fenólicos y capacidad antioxidante fueron analizados a través de un análisis de varianza (ANOVA) de dos factores (tratamiento-tiempo de almacenamiento). En caso de encontrar diferencias significativas se aplicó un test de Tukey, con un nivel de confianza del 95%.

El porcentaje de frutos infectados se analizó a través de un análisis de varianza (ANOVA) de dos factores (tratamiento-tiempo de almacenamiento). En caso de encontrar diferencias significativas se aplicó un test de Duncan, con un nivel de confianza del 95%.

Para evaluar el efecto del tratamiento y del tiempo de almacenamiento sobre la pérdida de peso y, para contemplar la falta de independencia de las muestras, se realizó un análisis de varianza (ANOVA) de medidas repetidas. En caso de encontrarse diferencias significativas, se aplicó un test de Tukey con un nivel de confianza del 95%.

Los resultados de color y propiedades mecánicas fueron analizados mediante un análisis de varianza multivariado (MANOVA) de dos factores (tratamiento y tiempo de almacenamiento). En caso de encontrarse diferencias significativas se aplicó el test de Hotelling corregido por Bonferroni con un nivel de confianza del 95%.

Como complemento del análisis multivariado se realizó un análisis de componentes principales (PCA) para visibilizar las variables más influyentes en la clasificación de las muestras y las tendencias de las mismas durante el almacenamiento o en distintos años de cosecha.

Previo a la realización de los análisis multivariados se detectaron los valores atípicos por medio de la distancia de Mahalanobis ($p \leq 0,001$) y se retiraron del conjunto de datos destinados a los análisis. La multicolinealidad entre las variables respuesta fue evaluada mediante la correlación de Pearson y se excluyeron del MANOVA y PCA aquellas variables fuertemente relacionadas entre sí.

Se comprobó la presunción de la homogeneidad de las matrices de varianza-covarianza (Prueba de homocedasticidad) y la distribución normal (Prueba de Shapiro-Wilks modificada) de los residuos.

Formulario N° 1

Fecha:/...../.....

Bandeja N°.....

Se le ha entregado una muestra de frutilla control (C) y otras dos muestras codificadas para que las compare respecto al control en cuanto a su diferencia global.

Instrucciones:

- 1) Pruebe la muestra control (C).
- 2) Pruebe una muestra codificada y evalúe la magnitud de la diferencia global de la muestra respecto del control (C).
- 3) Coloque una marca (X) en la opción de la escala que mejor exprese la diferencia de sensación percibida.
- 4) Repita este procedimiento con cada muestra codificada. De ser necesario enjuague la boca con agua antes de la evaluación de una nueva muestra. Tenga en cuenta que algunas de las muestras codificadas pueden ser las mismas que el control.

La diferencia global de la muestra con respecto al control es:

Código de la muestra		-----	-----
Ninguna	1	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Ligera	2	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Moderada	3	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Grande	4	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Muy grande	5	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

En caso de encontrar diferencia:

¿Puede describir qué diferencia encontró?

4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Tecnologías alternativas aplicadas como único factor de estrés previo al almacenamiento refrigerado

4.1.1 Tratamiento individual de ozono en fase acuosa

4.1.1.1 Concentración de ozono disuelto

En la **Figura 4.1** se presenta la evolución de la concentración de ozono disuelto en agua destilada en función del tiempo, cuando la columna contuvo o no frutillas sumergidas. Cuando la ozonización se realizó burbujando O_3 en agua destilada sin frutas, la concentración de ozono disuelto resultó mayor que cuando la ozonización se realizó en agua destilada con los frutos sumergidos. Esta diferencia puede atribuirse a la interacción del ozono con la materia orgánica y microorganismos provenientes de la fruta, que conllevaron a una concentración final de ozono disuelto de $3,5 \pm 0,5 \text{ mg.L}^{-1}$, mientras que en agua destilada sin fruta fue prácticamente el doble, $7,0 \pm 0,3 \text{ mg.L}^{-1}$. En ambos casos el tiempo de estabilización resultó de aproximadamente 5 min, indicando que la presencia de la fruta en la columna no influyó en el tiempo de estabilización del proceso.

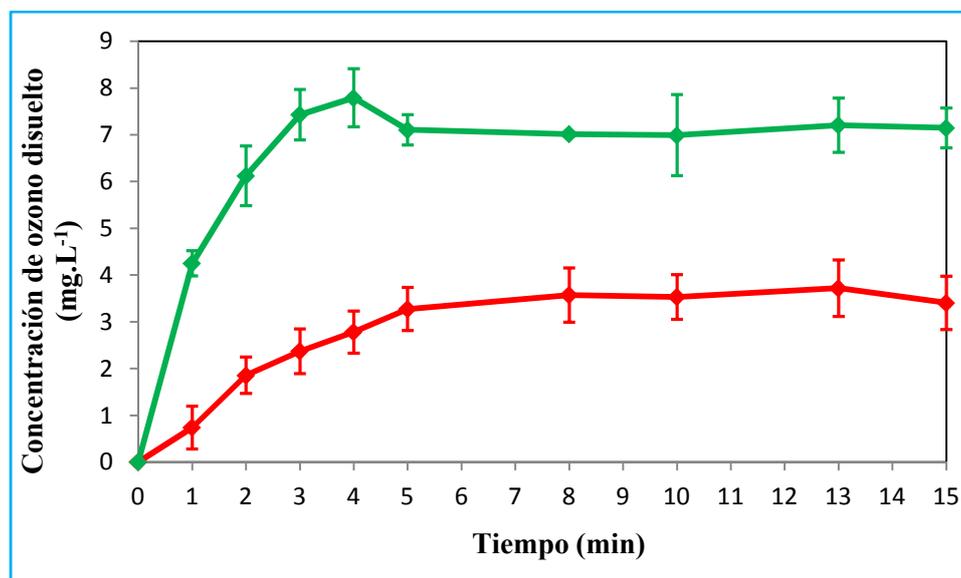


Figura 4.1. Concentración de ozono en la fase acuosa en función del tiempo de burbujeo a $20 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$. (◆) Agua destilada, (♦) Agua destilada con frutillas. Los valores representan los promedios y las barras verticales la desviación estándar.

4.1.1.2 *Efecto del tratamiento con ozono sobre la respuesta microbiana*

4.1.1.2.1 Evolución de la micoflora nativa de frutillas

Las **Figuras 4.2** y **4.3** muestran la evolución del porcentaje de frutos infectados durante el almacenamiento bajo refrigeración, correspondientes al estudio del efecto del ozono sobre la micoflora nativa de frutillas, realizado con los lotes cosechados en 2014 y 2015, respectivamente. En ambos lotes se observó un aumento del porcentaje de frutos infectados a lo largo del almacenamiento, tanto en las muestras ozonizadas como en los controles. Sin embargo, fueron evidentes algunas diferencias entre los lotes en cuanto al momento de aparición de la infección, el porcentaje de frutos infectados alcanzado al final del almacenamiento, y al efecto de los tratamientos con ozono aplicados.

En el caso del lote de 2014, los frutos control presentaron infección después del sexto día de almacenamiento, alcanzando un 35 % de frutos infectados al día 12. La exposición al ozono durante 5 min retrasó 2 días la aparición de infección y redujo el nivel de infección respecto al control, alcanzando un 12,5 % de muestras infectadas luego de 12 días de almacenamiento. El tratamiento con ozono durante 10 min presentó un comportamiento similar al control en cuanto al inicio de infección y del nivel de infección alcanzado, mientras que un tiempo de ozonización de 15 min adelantó 3 días el inicio de infección y presentó la mayor incidencia fúngica de todos los tratamientos durante el almacenamiento.

En el caso del lote de 2015, el nivel de infección alcanzado por el control al final del almacenamiento fue considerablemente superior (60 % de frutos infectados) al correspondiente a 2014 (35 %). En cuanto a los frutos tratados con ozono, ninguno de los tratamientos evaluados logró retrasar la aparición de infección respecto al control. Por el contrario, los tratamientos con ozono durante 5 y 10 min presentaron infección 2 días antes que el control, y 4 días antes en el caso del tratamiento de 15 min. Por otra parte, los frutos ozonizados durante 10 min presentaron la mayor incidencia fúngica durante el almacenamiento, mientras que el menor nivel de infección correspondió a un tiempo de exposición al ozono de 5 min (35 % de frutos infectados a los 12 días de almacenamiento).

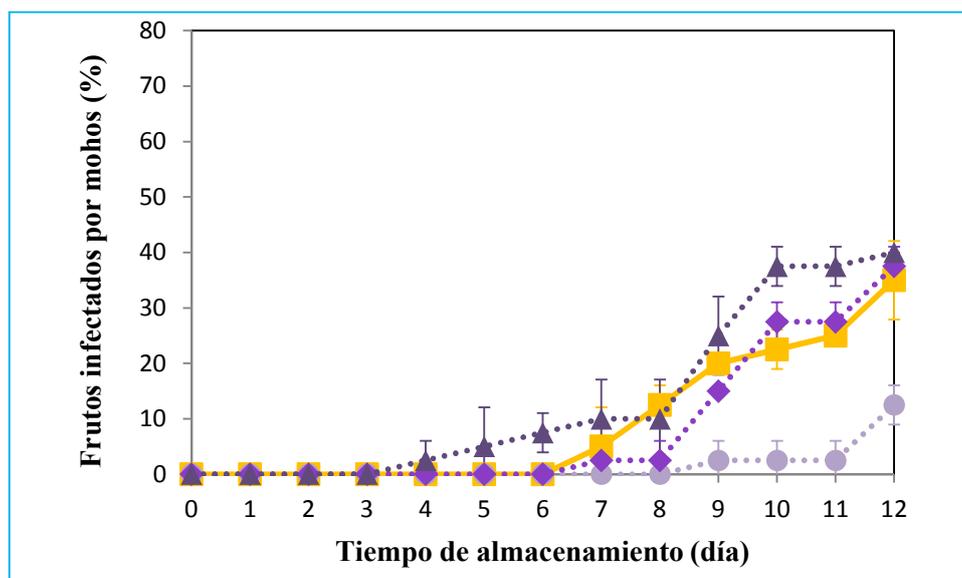


Figura 4.2. Porcentaje de frutos infectados (microflora nativa) en frutillas control y ozonizadas durante el almacenamiento a 5 ± 1 °C. Datos correspondientes a frutillas cosechadas en 2014. (■) Control, (●) 5 min O₃, (◆) 10 min O₃, (▲) 15 min O₃. Los datos representan los promedios y las barras verticales la desviación estándar.

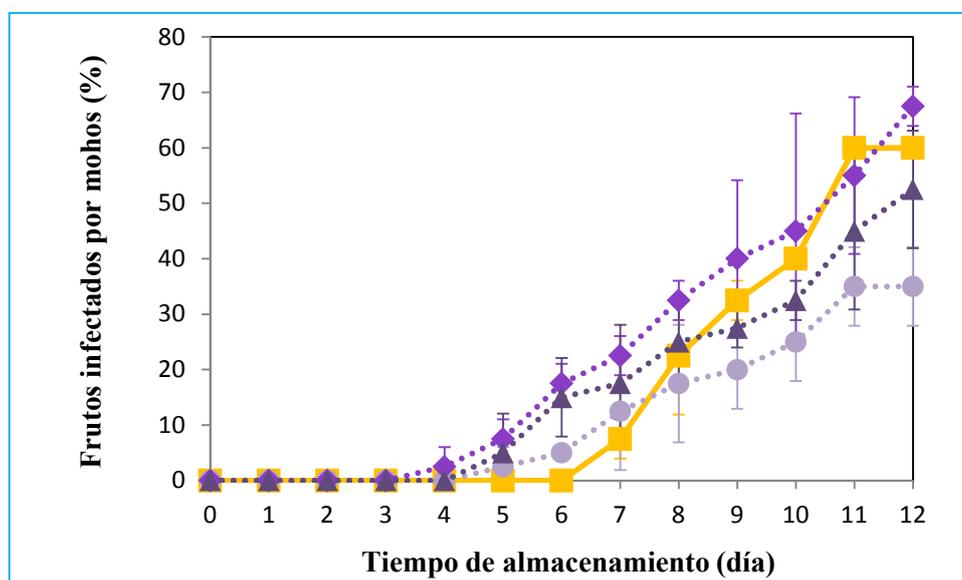


Figura 4.3. Porcentaje de frutos infectados (microflora nativa) en frutillas control y ozonizadas durante el almacenamiento a 5 ± 1 °C. Datos correspondientes a frutillas cosechadas en 2015. (■) Control, (●) 5 min O₃, (◆) 10 min O₃, (▲) 15 min O₃. Los datos representan los promedios y las barras verticales la desviación estándar.

Estas diferencias entre los lotes analizados indicarían una dependencia entre el nivel de contaminación inicial del lote, influenciada por las condiciones climáticas y de manipulación a las que fue sometido el cultivo, y la capacidad de los tratamientos con ozono en retardar la infección de los frutos. No obstante, el tratamiento con ozono durante 5 min mostró ser efectivo para reducir la cantidad de frutos infectados a lo largo del almacenamiento, independientemente del nivel de contaminación inicial de la cosecha. La reducción alcanzada respecto al control para el día 12 fue de alrededor del 25 % en ambos lotes.

Como se mencionó en la **Sección 3.3.1.4**, con el fin de evaluar el efecto *per se* del ozono en el proceso completo de lavado, se realizaron una serie de controles que consistieron en frutos que fueron lavados en la columna durante los mismos tiempos empleados en los tratamientos con ozono pero burbujeando oxígeno con el generador de ozono apagado. En la **Figura 4.4** se presenta la evolución del porcentaje de frutos infectados correspondiente a los controles de lavado (CL) y los frutos sin tratamiento (Control).

Todos los tiempos de lavado adelantaron 2 días la aparición de infección y presentaron un nivel de infección similar al control sin tratar durante el almacenamiento.

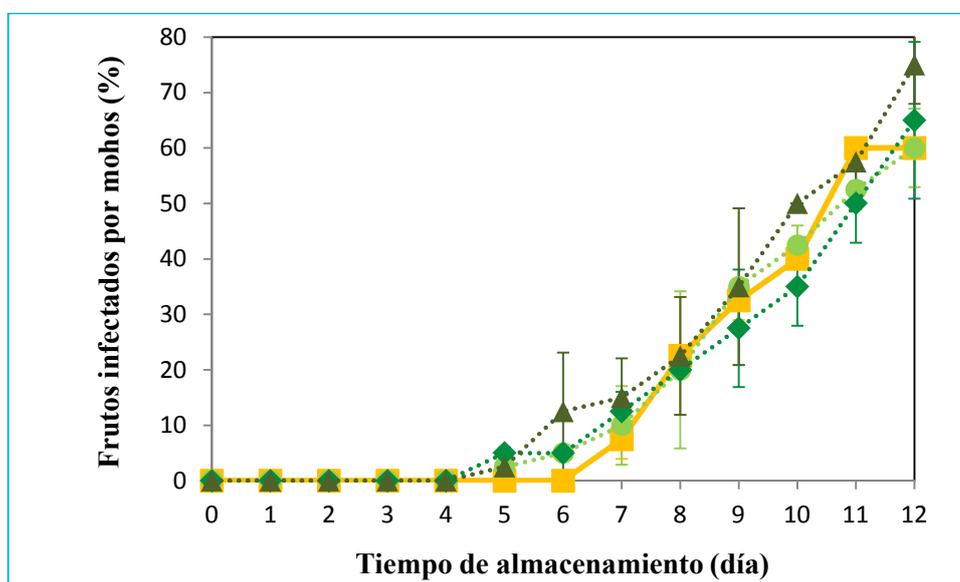


Figura 4.4. Porcentaje de frutos infectados (micoflora nativa) en frutillas control y controles de lavado durante el almacenamiento a 5 ± 1 °C. Datos correspondientes a frutillas cosechadas en 2015. (■) Control, (●) CL - 5 min, (◆) CL - 10 min, (▲) CL - 15 min. Los datos representan los promedios y las barras verticales la desviación estándar.

En las **Tablas 4.1** y **4.2** se presentan los resultados de la prueba de contraste de Duncan y del Análisis de la Varianza (ANOVA), respectivamente, aplicados a los resultados de incidencia fúngica de los lotes estudiados. La interacción entre los factores “tratamiento” y “tiempo de almacenamiento” no resultó significativa ($F_{6,22} = 2,14$, $p = 0,124$; $F_{12,21} = 1,97$, $p = 0,084$ para 2014 y 2015, respectivamente), pero los efectos principales de cada factor fueron estadísticamente significativos ($p < 0,05$) (**Tabla 4.2**).

Tabla 4.1. Evolución del porcentaje de frutos infectados por la micoflora nativa de frutillas control, controles de lavado y ozonizadas durante el almacenamiento a 5 ± 1 °C.

Lote 2014				
Tratamiento	Tiempo de almacenamiento (día)			
	4	8	12	
Control	0,0 ± 0,0	12,5 ± 17,7	35,0 ± 7,1	a
5 min O₃	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	12,5 ± 3,5	b
10 min O₃	0,0 ± 0,0	2,5 ± 3,5	37,5 ± 10,6	a
15 min O₃	2,5 ± 3,5	10,0 ± 0,0	40,0 ± 0,0	a
	A	A	B	

Lote 2015				
Tratamiento	Tiempo de almacenamiento (día)			
	4	8	12	
control	0,0 ± 0,0	22,5 ± 10,6	60,0 ± 0,0	b
CL - 5 min	0,0 ± 0,0	20,0 ± 14,1	60,0 ± 7,1	b
CL - 10 min	0,0 ± 0,0	20,0 ± 0,0	65,0 ± 14,1	b
CL - 15 min	0,0 ± 0,0	22,5 ± 10,6	75,0 ± 7,1	b
5 min O₃	0,0 ± 0,0	17,5 ± 10,6	35,0 ± 7,1	a
10 min O₃	2,5 ± 3,5	32,5 ± 3,5	67,5 ± 3,5	b
15 min O₃	0,0 ± 0,0	25,0 ± 7,1	52,5 ± 10,6	a, b
	A	B	C	

Los valores fueron expresados como el promedio de cada tratamiento ± desviación estándar.
 Los tratamientos seguidos por distinta letra minúscula difieren significativamente ($p < 0,05$).
 Los días de almacenamiento con distinta letra mayúscula difieren significativamente ($p < 0,05$).

Tabla 4.2. Resultados del ANOVA para la evolución del porcentaje de frutos infectados por la micoflora nativa de frutillas control, controles de lavado y ozonizadas durante el almacenamiento a 5 ± 1 °C.

Lote 2014				
Fuente	CM	GL	F	p-valor
Día	212,15	3	4,97	0,0181
Tratamiento	2126,04	2	49,78	<0,0001
Tratamiento*Día	91,32	6	2,14	0,1237
Error	42,71	12		
R^2_{aj}	0,83			
Lote 2015				
Fuente	CM	GL	F	p-valor
Día	12380,36	2	239,07	<0,0001
Tratamiento	173,61	6	3,35	0,0178
Tratamiento*Día	101,88	12	1,97	0,0842
Error	51,79	21		
R^2_{aj}	0,92			

Ninguno de los controles de lavado presentó diferencias significativas respecto al control (frutos sin tratar). En cuanto a los tiempos de exposición al ozono que fueron evaluados, sólo el tratamiento de 5 min presentó una reducción significativa en el porcentaje de frutos infectados respecto al control y a su correspondiente control de lavado (CL - 5 min) durante el almacenamiento.

En un estudio realizado por Alexandre y col. 2011, con el objeto de determinar el efecto del ozono en fase acuosa sobre el recuento de mesófilos totales en frutillas (cultivar no especificado), se evaluaron dos concentraciones de ozono ($0,3$ y 2 mg.L^{-1}) y diferentes tiempos de exposición (1, 2 y 3 min). En el caso de la menor concentración, los tratamientos durante 1 y 2 min resultaron en reducciones significativas respecto al control lavado con agua (1,3 y 0,8 reducciones logarítmicas, respectivamente). Un tiempo de exposición de 3 min y una concentración de ozono de $0,3$ mg.L^{-1} no logró reducir significativamente el recuento de mesófilos respecto a un lavado con agua. Estos

autores atribuyeron este comportamiento a las posibles heridas superficiales ocasionadas en el fruto durante la agitación propia del tratamiento, que liberarían compuestos orgánicos disponibles a reaccionar con el ozono antes que los microorganismos. En los frutos tratados con la mayor concentración de ozono, el efecto sobre la carga microbiana fue significativo para todos los tiempos de tratamiento estudiados, obteniéndose mayores reducciones con el tratamiento de 2 mg.L^{-1} de ozono durante 3 min ($\sim 2,3$ ciclos logarítmicos). Si bien esta concentración de ozono es muy similar a la utilizada en esta tesis, la relación entre agua ozonizada/masa de fruta fue aproximadamente 60 veces mayor. No obstante, pueden señalarse resultados coincidentes entre ambos trabajos en cuanto a la individualización del efecto del ozono *per se* del lavado con agua, y de la limitante en el tiempo de exposición por las posibles lesiones ocasionadas en los frutos como consecuencia de la agitación.

Bialka y col. (2007) observaron reducciones logarítmicas de 1,3 y 1,4 en frutillas (cultivar no especificado) inoculadas con *Escherichia coli* O157:H7 y *Salmonella* respectivamente, al ser tratadas con $1,8 \text{ mg O}_3.\text{L}^{-1}$ durante 4 min a $20 \text{ }^\circ\text{C}$. En este estudio también determinaron que la desinfección se debía fundamentalmente al efecto del ozono más que a la agitación producida por el burbujeo del gas en el agua.

En contraste con nuestros resultados, Aday y col. (2014) observaron una inhibición completa en el desarrollo fúngico nativo de frutillas cv. Camarosa sometidas a tratamientos con concentraciones de ozono de $0,075$ y $0,15 \text{ mg.L}^{-1}$ durante 2 y 5 min y almacenadas tres semanas a $4 \text{ }^\circ\text{C}$. Al evaluar el efecto de una concentración de ozono mayor ($0,25 \text{ mg.L}^{-1}$), no se obtuvo una disminución significativa del nivel de infección respecto al control. Si bien en este estudio no se informó la relación entre la masa de fruta y el volumen de agua ozonizada utilizada ni la cantidad de réplicas analizadas para la evaluación del decaimiento fúngico, cabe destacarse que las concentraciones de ozono ensayadas fueron considerablemente menores a las utilizadas en esta tesis. A pesar de las diferencias mencionadas, se reitera el hecho de que mayores dosis de ozono no conllevan necesariamente a una mayor inhibición/inactivación en la flora nativa de las frutillas.

La efectividad del ozono en fase acuosa ha sido estudiada también en otras bayas. Por ejemplo, Pangloli y col. (2013) investigaron el efecto de tratamientos de lavado en agua ozonizada ($1,5 \text{ mg.L}^{-1}$ y tiempos de exposición de 1 a 5 min) sobre arándanos previamente inoculados con *E. coli* O157:H7, obteniendo reducciones logarítmicas de 2,28, 3,05 y 3,5 para tiempos de exposición de 1, 3 y 5 min, respectivamente. Cuando

los frutos fueron lavados con agua potable durante iguales períodos de tiempo, las reducciones alcanzadas fueron menores. Nuevamente, se refuerza la evidencia de un efecto específico del ozono en la desinfección respecto a un lavado con agua.

4.1.1.2.2 Evolución de *Botrytis cinerea* inoculado en frutillas

En la **Figura 4.5** se presenta el porcentaje de frutos infectados con *Botrytis cinerea* (inoculado artificialmente) a lo largo del almacenamiento bajo refrigeración, en muestras control y tratadas con ozono. A diferencia de lo observado en la micoflora nativa, todos los tratamientos con ozono lograron retardar la aparición de infección como mínimo 1 día. El tiempo de exposición al ozono de 5 min resultó ser el más efectivo en retardar la infección, que se detectó a partir del quinto día de almacenamiento.

Las principales diferencias entre los distintos tiempos de exposición al ozono y respecto al control se evidenciaron al inicio del almacenamiento hasta el día 6, aproximadamente. A partir de ese momento, en general, las diferencias fueron minimizándose. Si bien al día 12 todos los tratamientos mostraron un nivel similar de infección respecto al control, los tratamientos con ozono presentaron un nivel de infección levemente menor al control durante el almacenamiento, siendo el tratamiento de 5 min el que más redujo la infección.

En la **Figura 4.6** se presenta la evolución del porcentaje de frutos infectados del control y de los controles de lavado inoculados. Todos los controles de lavado presentaron un nivel de infección menor respecto al control inoculado sin tratar, a excepción del CL – 5 min que presentó un porcentaje de infección levemente mayor a los días 6 y 7 de almacenamiento. El CL – 15 min presentó el menor nivel de infección durante el período de almacenamiento estudiado.

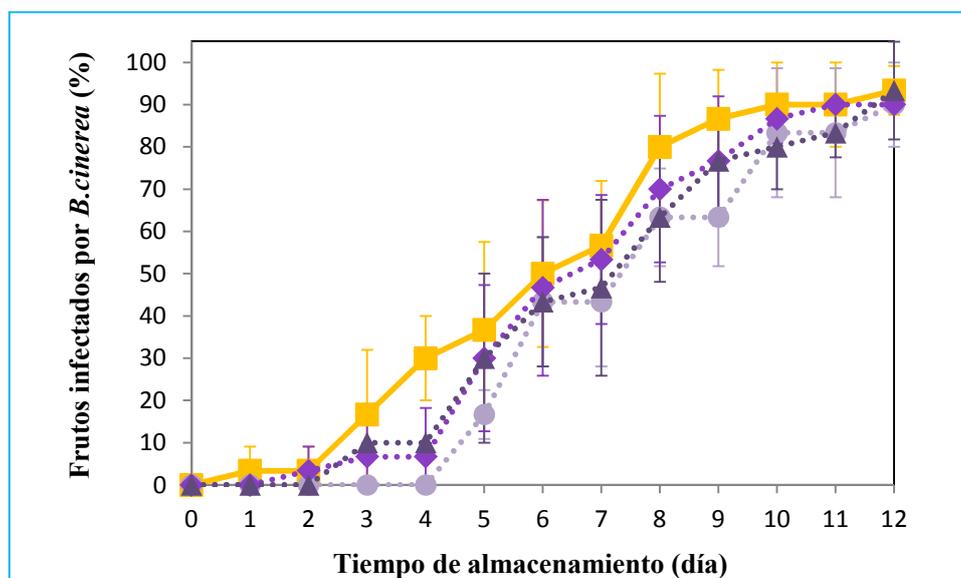


Figura 4.5. Incidencia de *Botrytis cinerea* (%) en frutillas control y tratadas con ozono en fase acuosa durante el almacenamiento a 5 ± 1 °C. Datos correspondientes a frutillas cosechadas en 2015. (■) Control inoculado, (●) 5 min O₃, (◆) 10 min O₃, (▲) 15 min O₃. Los datos representan los promedios y las barras verticales la desviación estándar.

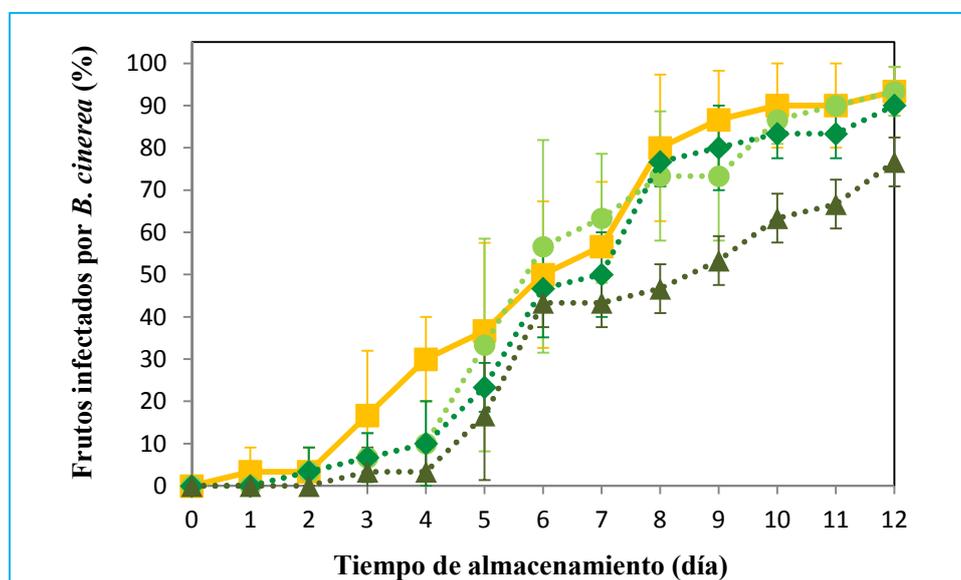


Figura 4.6. Incidencia de *Botrytis cinerea* (%) en frutillas control y controles lavados durante el almacenamiento a 5 ± 1 °C. Datos correspondientes a frutillas cosechadas en 2015. (■) Control inoculado, (●) CL - 5 min, (◆) CL - 10 min, (▲) CL - 15 min. Los valores representan los promedios y las barras verticales la desviación estándar.

Al comparar los resultados obtenidos para los controles de lavado y el tratamiento con ozono en fase acuosa para iguales tiempos de exposición, se pueden observar algunas diferencias interesantes. En el caso de un tiempo de exposición de 5 min, puede observarse un retardo en la aparición de infección del tratamiento con ozono de 3 días, respecto al momento de inicio de infección del CL – 5 min. Además, el nivel de infección alcanzado por el tratamiento con ozono durante el almacenamiento fue menor al correspondiente control de lavado, hasta el día 10 de almacenamiento donde los valores de infección para todos los tratamientos tendieron a igualarse entre sí y respecto al control inoculado. En el caso de un tiempo de exposición de 10 min, la presencia del ozono no implicó una diferencia significativa respecto al simple lavado de los frutos.

Un comportamiento inesperado se presentó en el caso de un tiempo de exposición de 15 minutos; durante los primeros 6 días de almacenamiento no se evidenciaron diferencias considerables entre el tratamiento con ozono y el lavado, aunque en los días posteriores el porcentaje de frutos infectados de los frutos ozonizados fue superior al del control de lavado.

En las **Tablas 4.3** y **4.4** se presentan los resultados de la prueba de contraste de Duncan y del Análisis de la Varianza (ANOVA), respectivamente, aplicados a los resultados del porcentaje de frutos infectados con *Botrytis cinerea* durante el almacenamiento a 5 ± 1 °C. La interacción de los factores “tratamiento” y “tiempo de almacenamiento” no resultó significativa ($F_{18,55} = 1,12$, $p = 0,356$), siendo ambos efectos principales significativos ($p < 0,05$) (**Tabla 4.4**). A pesar de las diferencias de comportamiento observadas en la incidencia de *B. cinerea* entre los frutos tratados con ozono y los controles lavados durante 15 min, las mismas no resultaron significativas. De forma similar a lo observado en la micoflora nativa, el único tratamiento cuyo porcentaje de frutos infectados fue estadísticamente menor a los controles (control y control lavado), correspondió al tiempo de tratamiento de 5 min.

Existen escasos reportes en la literatura en donde se haya evaluado el efecto del ozono en fase acuosa sobre *Botrytis cinerea*, ya sea en estudios *in vitro* o en una matriz vegetal. No obstante, en estudios realizados con tratamientos con ozono en fase gaseosa, varios autores han demostrado en ensayos *in vitro* el efecto *per se* del ozono para inhibir el crecimiento y la esporulación de *B. cinerea* (Nadas y col., 2003; Minas y col., 2010).

Tabla 4.3. Evolución del porcentaje de frutos infectados con *Botrytis cinerea* en frutillas control, controles de lavado y ozonizadas, durante el almacenamiento a 5 ± 1 °C.

Tratamiento	Tiempo de almacenamiento (día)				
	2	4	6	8	
Control	3,3 ± 5,8	30,0 ± 10,0	50,0 ± 17,3	80,0 ± 17,3	a
CL - 5 min	3,3 ± 5,8	10,0 ± 10,0	70,0 ± 14,1	73,3 ± 15,3	a
CL - 10 min	3,3 ± 5,8	10,0 ± 10,0	46,7 ± 11,5	76,7 ± 5,8	a, b
CL - 15 min	0,0 ± 0,0	3,3 ± 5,8	43,3 ± 5,8	46,7 ± 5,8	c
5 min O ₃	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	43,3 ± 15,3	63,3 ± 11,5	b, c
10 min O ₃	3,3 ± 5,8	6,7 ± 11,5	46,7 ± 20,8	70,0 ± 17,3	a, b
15 min O ₃	0,0 ± 0,0	10,0 ± 0,0	43,3 ± 15,3	63,3 ± 15,3	b, c
	A	B	C	D	

Los valores fueron expresados como el promedio de cada tratamiento ± desvío estándar.

Los tratamientos seguidos por distinta letra minúscula difieren significativamente ($p < 0,05$).

Los días de almacenamiento con distinta letra mayúscula difieren significativamente ($p < 0,05$)

Tabla 4.4. Resultados del ANOVA para la evolución del porcentaje de frutos infectados por *B. cinerea* en muestras control, controles de lavado y ozonizadas, durante el almacenamiento a 5 ± 1 °C.

Fuente	CM	GL	F	p-valor
Día	480,13	6	3,96	0,0023
Tratamiento	20507,24	3	169,18	<0,0001
Tratamiento*Día	136,18	18	1,12	0,3561
Error	121,21	55		
R ² _{aj}	0,86			

Además, se ha reportado que la actividad antimicrobiana del ozono en vegetales podría ser el resultado no sólo del daño oxidativo de componentes celulares vitales de los microorganismos sino también a un efecto indirecto a través de la inducción de mecanismos de defensa. Se ha visto que la inducción de una respuesta de defensa al ataque de patógenos es dosis-dependiente y está relacionada con la inducción de sistemas antioxidantes, la acumulación de compuestos fenólicos con actividad antimicrobiana (fitoalexinas) y proteínas relacionadas con la patogénesis (Kangasjärvi y col., 1994; Sandermman y col., 1998). En particular, Minas y col. (2010) demostraron que la inhi-

bición de *B. cinerea* en kiwi como resultado de la exposición de los frutos a ozono gaseoso ($0.3 \mu\text{L. L}^{-1}$ durante 2 a 144 horas a 0°C) previo a la inoculación con el patógeno, podría estar asociada con la inducción de mecanismos de defensa.

4.1.1.3 Efecto del tratamiento con ozono en fase acuosa sobre el color

En la **Tabla 4.5** se presentan los resultados de la medición de color de frutos control y ozonizados durante el almacenamiento a $5 \pm 1^\circ\text{C}$. Para el análisis de los datos mediante el MANOVA y PCA, se excluyeron las variables croma (C^*) y ángulo de tono (h), dado su elevado grado de correlación con las variables a^* y b^* . Los coeficientes de correlación de Pearson entre C^* y las variables a^* y b^* fueron de 0,97 y 0,94, respectivamente, mientras que el coeficiente de correlación entre h y b^* fue de 0,89. En la **Tabla 4.6** se presentan los resultados del análisis estadístico de los datos. El MANOVA indicó que la interacción entre los efectos “tratamiento” y “día de almacenamiento” resultó significativa ($F_{9, 388} = 2,17$, $p = 0,0237$).

En general, los frutos control presentaron cambios leves pero significativos en el color durante el almacenamiento, y si bien la variación de los parámetros colorimétricos no siguió una tendencia clara, los cambios más grandes se observaron al día 12. Dichas modificaciones se asociaron con un aumento de la luminosidad (L^*) y una disminución de a^* y b^* . Inmediatamente después de aplicados los tratamientos de ozonización (día 0), no se observó un efecto significativo de los mismos sobre las propiedades ópticas de las muestras, a excepción de los frutos expuestos a ozono durante 10 min. Al cuarto día de almacenamiento, se observó una disminución de los parámetros a^* y b^* en todas las muestras tratadas con ozono, que sólo resultó en cambios significativos en el caso del tratamiento de 10 min. Estos frutos presentaron valores de a^* y b^* un 10 y 15 % menores que los correspondientes al control. Estas coordenadas de color tendieron a incrementarse al día 8 de almacenamiento y volvieron a disminuir al día 12, pero siempre se mantuvieron levemente inferiores a los controles almacenados. Sin embargo, en ninguno de esos períodos los frutos ozonizados resultaron significativamente diferentes al correspondiente control almacenado.

Las mismas tendencias se repitieron en las funciones croma (C^*) y en el ángulo de tono (h), aunque en esta última, las diferencias fueron más leves, ya sea entre tratamientos como en los diferentes períodos de almacenamiento estudiados.

Tabla 4.5. Parámetros y funciones colorimétricas de frutillas control y ozonizadas durante el almacenamiento a $5 \pm 1^\circ \text{C}$.

Tratamiento	Día	L*	a*	b*	C*	h	
Control	0	35,0 ± 3,1	39,6 ± 2,5	26,2 ± 4,2	47,6 ± 4,3	33,2 ± 3,0	b
	4	36,2 ± 2,8	39,3 ± 2,9	25,5 ± 3,8	47,0 ± 4,3	32,6 ± 2,6	c, d
	8	35,9 ± 2,9	39,6 ± 3,3	26,1 ± 4,2	47,5 ± 4,9	33,1 ± 2,7	b, c
	12	37,1 ± 2,2	37,1 ± 3,8	23,8 ± 4,1	44,1 ± 5,3	32,4 ± 2,4	a
5 min O ₃	0	33,9 ± 2,8	38,9 ± 3,3	25,0 ± 4,3	46,4 ± 4,8	32,4 ± 3,1	b
	4	35,0 ± 2,9	36,0 ± 3,8	22,2 ± 4,9	42,4 ± 5,7	31,3 ± 3,6	d
	8	35,2 ± 2,7	38,4 ± 4,2	24,7 ± 4,8	45,8 ± 5,8	32,4 ± 3,2	b, c, d
	12	36,2 ± 2,7	35,8 ± 3,7	22,6 ± 4,4	42,4 ± 5,3	32,0 ± 2,8	a
10 min O ₃	0	35,1 ± 2,9	38,1 ± 2,7	23,8 ± 3,9	45,0 ± 3,9	31,8 ± 3,3	c, d
	4	35,5 ± 2,4	35,3 ± 3,7	21,7 ± 4,8	41,6 ± 5,5	31,3 ± 3,4	a
	8	35,4 ± 2,3	37,2 ± 2,6	24,2 ± 3,9	44,5 ± 4,1	32,8 ± 2,9	c, d
	12	36,9 ± 2,4	35,6 ± 3,0	22,3 ± 3,7	42,1 ± 4,2	31,9 ± 2,9	a
15 min O ₃	0	35,1 ± 2,2	40,0 ± 2,9	25,5 ± 3,7	47,2 ± 4,2	32,5 ± 2,7	b, c
	4	35,5 ± 2,4	37,1 ± 3,9	23,0 ± 4,1	43,8 ± 5,3	31,4 ± 2,8	d
	8	35,8 ± 2,3	38,2 ± 2,9	24,1 ± 3,3	45,2 ± 3,9	32,0 ± 2,6	c, d
	12	37,0 ± 2,4	35,8 ± 3,7	22,6 ± 4,0	42,4 ± 5,0	31,9 ± 2,7	a

Valores promedio ± desviación estándar. Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

Con el fin de visualizar de manera sencilla la evolución de los parámetros colorimétricos de frutos tratados y control durante el almacenamiento, se realizó el Análisis de Componentes Principales (PCA) que se presenta en la **Figura 4.7**. Las primeras dos componentes fueron suficientes para explicar el 99,3 % de la variabilidad de los datos (CP1: 74,4 %; CP2: 24,9 %). Las variables a* y b* presentaron una correlación positiva en ambas componentes, mientras que L* presentó una correlación negativa en la CP1 y positiva en la CP2.

Tabla 4.6. Resultados del MANOVA realizado sobre los parámetros colorimétricos obtenidos en frutos ozonizados y controles durante el almacenamiento refrigerado.

Fuente	Estadístico	GL	F	p-valor
Día	1,04	3	134,48	<0,0001
Tratamiento	0,16	3	20,86	<0,0001
Tratamiento*Día	0,05	9	2,17	0,0237
Error	388			

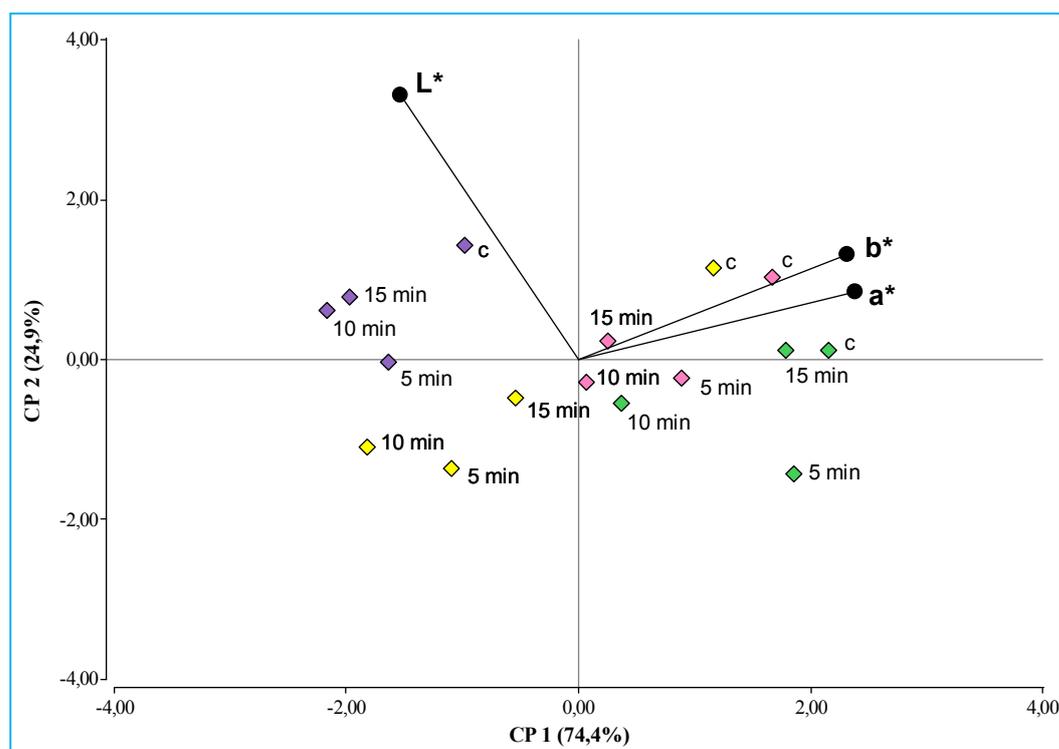


Figura 4.7. Análisis de Componentes Principales correspondiente a los resultados de las mediciones de color de frutos control y ozonizados almacenados a $5 \pm 1^\circ \text{C}$. Día 0 (◆), día 4 (◇), día 8 (◊) y día 12 (◇).

En concordancia con los resultados del MANOVA, el PCA mostró una tendencia de las muestras a agruparse por día de almacenamiento. Al día 0, el tratamiento de 10 min de ozono se separó de los restantes tratamientos, localizándose más a la izquierda debido principalmente, a menores valores de b^* y a^* . A partir del cuarto día de alma-

cenamiento, las muestras ozonizadas tendieron a agruparse entre sí y alejarse del control almacenado, siendo el más distante el tratamiento de 10 min, que resultó estadísticamente diferente al control. En los posteriores períodos de almacenamiento, las distancias entre las muestras ozonizadas y los respectivos controles almacenados fueron reduciéndose al punto de no presentar diferencias significativas en el MANOVA al día 12. La CP2 mostró a los controles almacenados en los cuadrantes positivos, mientras que los frutos ozonizados tendieron a ubicarse alrededor del eje y hacia los cuadrantes negativos hasta el octavo día de almacenamiento. Esto resultó coherente con los mayores valores de L^* , a^* y b^* que presentaron los controles respecto a los tratamientos a los 4 y 8 días de almacenamiento. Al día 12, todas las muestras tendieron a agruparse en el eje positivo.

En síntesis, si bien el tratamiento con ozono mostró afectar levemente las propiedades ópticas de las frutillas, este efecto no resultó significativo a excepción del tratamiento de 10 min. Sería de esperarse que una mayor dosis acentuara dichos efectos, pero esto no fue observado en el tratamiento de 15 min. Por otra parte, la disminución en los parámetros a^* y b^* , y en concordancia C^* , en los frutos almacenados, y en mayor medida en los frutos ozonizados 10 min, estaría asociada a una disminución de la intensidad de color, resultando éste menos vívido. A pesar que, según el análisis estadístico, estos cambios resultaron significativos las diferencias en los valores correspondientes a cada tratamiento y día de almacenamiento, no resultarían de una magnitud considerable al compararlos con las correspondientes desviaciones estándar, quedando en algunos casos incluidas dentro del error de la medición.

A diferencia de este estudio, Aday y col. (2014) y Alexandre y col. (2012), al tratar frutillas con concentraciones de ozono menores a las ensayadas en esta tesis, observaron cambios menos drásticos durante el almacenamiento en los frutos expuestos al ozono en comparación a los controles.

4.1.1.4 *Efecto del tratamiento con ozono sobre la pérdida de peso*

Los resultados correspondientes a la pérdida de peso de frutillas tratadas y control durante el almacenamiento se presentan en la **Figura 4.8** y el correspondiente análisis estadístico en la **Tabla 4.7**. La interacción entre los factores “tratamiento” y “tiempo de almacenamiento” resultó significativa ($F_{6, 176} = 8,65$, $p < 0,0001$).

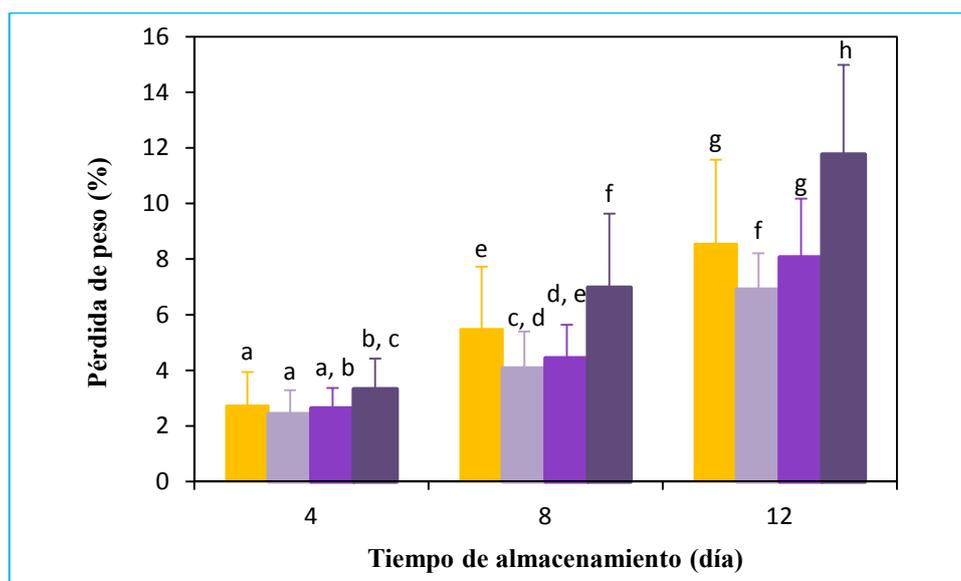


Figura 4.8. Porcentaje de pérdida de peso de frutillas ozonizadas y control durante el almacenamiento a 5 ± 1 °C. (■) Control, (●) 5 min O₃, (◆) 10 min O₃, (▲) 15 min O₃. Las columnas representan el promedio de cada tratamiento y las barras la desviación estándar. Los promedios seguidos de distinta letra minúscula difieren significativamente ($p < 0,05$).

Tabla 4.7. Resultados del ANOVA para la evolución de la pérdida de peso en frutos ozonizados y control durante el almacenamiento a 5 ± 1 °C.

Fuente	CM	GL	F	p-valor
Día	38,42	2	919,41	<0,0001
Tratamiento	4,21	3	100,77	<0,0001
Tratamiento*Día	0,35	6	8,36	<0,0001
Error	0,04	176		
R ² _{aj}	0,90			

En todos las muestras (tratadas y control) se observó una pérdida de peso significativa durante el almacenamiento. Sin embargo, los frutos expuestos al ozono durante 5 min presentaron una pérdida de peso significativamente menor al control a los 8 y 12 días del almacenamiento, mientras que en las muestras tratadas por 10 min las diferencias no fueron significativas. Por el contrario, un tiempo de exposición al ozono mayor (15 min) produjo un incremento significativo en la pérdida de peso en relación a las muestras no tratadas.

Luego de 12 días de almacenamiento, los frutos control mostraron una pérdida de peso de ~9 %, mientras que la de los frutos ozonizados durante 5 y 15 min fue de ~7

% y ~12 %, respectivamente. En todos los casos, la pérdida de peso superaría los límites de aceptabilidad del consumidor, establecida en un 6 % (Nunes y col., 2007).

Estos resultados demuestran que la pérdida de peso de los frutos ozonizados fue dosis-dependiente: a mayor tiempo de exposición, mayor pérdida de peso durante el almacenamiento. La reducción de la pérdida de peso respecto al control observada en los frutos expuestos a ozono durante 5 min se correlacionaron con los cambios micro y ultra-estructurales que se detallarán en las secciones venideras.

4.1.1.5 *Efecto del tratamiento con ozono sobre las propiedades mecánicas*

Los perfiles de punción característicos de frutillas tratadas y control a los 0 y 8 días de almacenamiento se presentan en las **Figuras 4.9** y **4.10**, respectivamente. Como puede observarse, la curva Fuerza versus Deformación presentó un incremento lineal hasta llegar al punto de ruptura de la epidermis (F_R). La epidermis contribuyó con aproximadamente el 50 - 55% de la firmeza del fruto hasta el punto de ruptura, tanto en los frutos control como en los ozonizados. El resto del perfil correspondió al avance de la punta en el receptáculo, evidenciándose características reológicas diferentes a medida que la misma atravesaba los distintos tipos de tejidos (tejido cortical, aquenios y tejido vascular). Un comportamiento similar al observado en este caso fue publicado por Duarte y col. (2016) en frutillas cv. Camarosa. Luego de 8 días de almacenamiento, los frutos tratados y control presentaron un comportamiento mecánico muy similar, con un leve incremento en la deformación al punto de ruptura de la epidermis respecto al día 0.

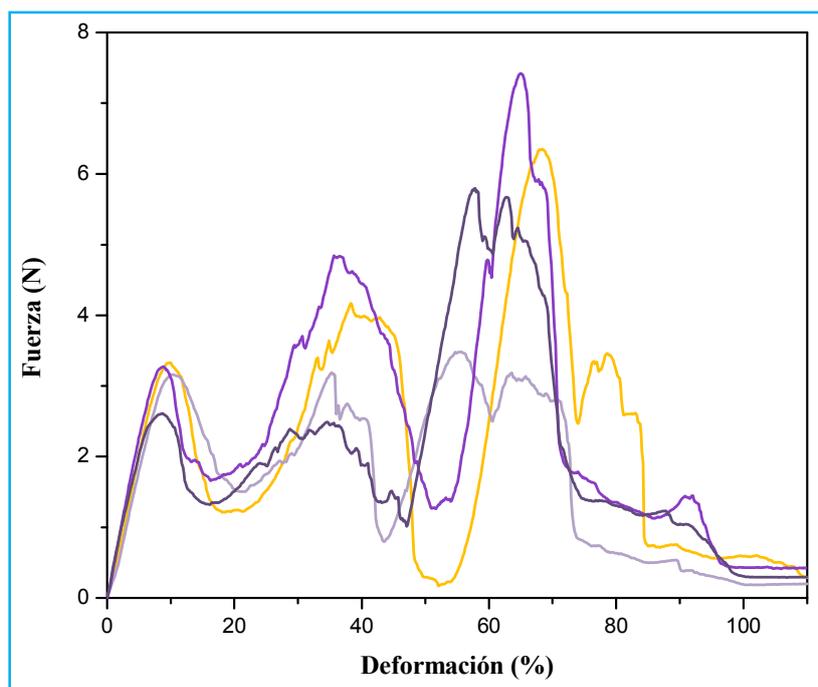


Figura 4.9. Perfiles característicos del ensayo de punción de frutillas ozonizadas y control al día 0 del almacenamiento a 5 ± 1 °C. (■) Control, (●) 5 min O₃, (◆) 10 min O₃, (▲) 15 min O₃.

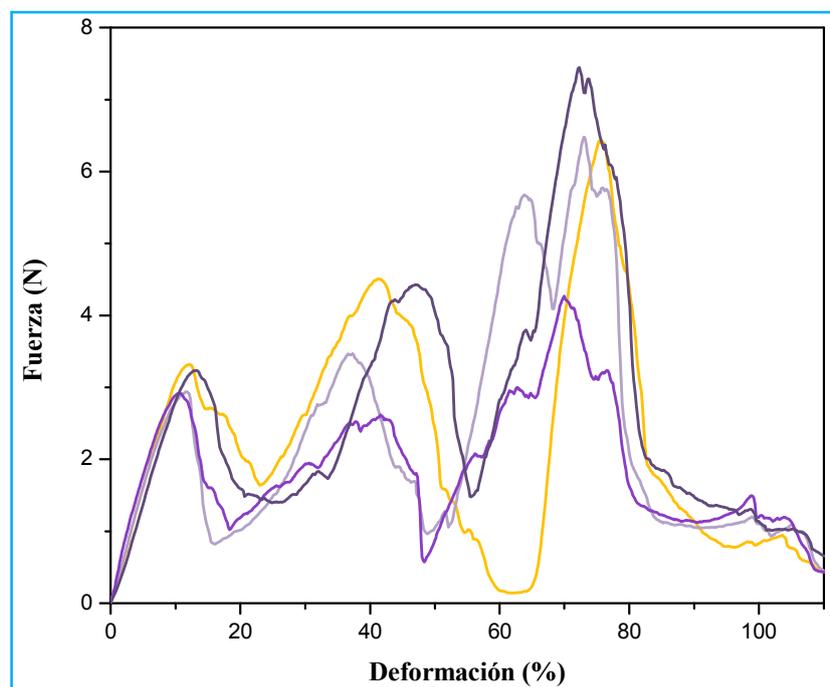


Figura 4.10. Perfiles característicos del ensayo de punción de frutillas ozonizadas y control luego de 8 días de almacenamiento a 5 ± 1 °C. (■) Control, (●) 5 min O₃, (◆) 10 min O₃, (▲) 15 min O₃.

En la **Tabla 4.8** se presentan los resultados del ensayo de punción de frutillas ozonizadas y control durante el almacenamiento correspondientes a los lotes de 2014 y 2015. Los resultados del MANOVA para cada lote se presentan en la **Tabla 4.9**.

Las variables F_R y W presentaron un elevado coeficiente de correlación de Pearson ($\sim 0,9$), por lo que se decidió excluir esta última variable de los análisis multivariados (MANOVA y PCA). En ambos lotes estudiados, la interacción entre los factores "tratamiento" y "tiempo de almacenamiento" resultó significativa ($F_{9, 505} = 4,3$, $p < 0,0001$ y $F_{9, 548} = 2,05$, $p = 0,0318$ para 2014 y 2015 respectivamente).

Al comparar las propiedades mecánicas de los frutos tratados y control de ambos lotes se pudieron observar algunas similitudes. En general, los frutos ozonizados no presentaron diferencias significativas respecto al control inmediatamente después de realizados los tratamientos (día 0) o durante el almacenamiento. Además, las propiedades mecánicas de las frutillas control y ozonizadas resultaron significativamente diferentes al día 12, respecto al día 0, a excepción del tratamiento de 15 min del lote de 2014. Por lo tanto, los cambios observados en las propiedades mecánicas podrían atribuirse en mayor medida al proceso de maduración y senescencia propio del fruto, sin un efecto significativo del tratamiento.

En la **Figura 4.11** se presentan los resultados correspondientes al PCA realizado con los resultados de los parámetros mecánicos de los dos lotes estudiados. Dos componentes fueron suficientes para explicar el 99 % de la variabilidad de los datos. La CP1 explicó el 62 % de la variabilidad total y clasificó las muestras de acuerdo a sus valores de Ed (correlación negativa) y D (correlación positiva), mientras que la CP2 explicó el 37 % restante de la variabilidad total y clasificó las muestras en cuanto a sus valores de F_R y Ed (ambas correlaciones positivas). La CP1 mostró diferencias marcadas entre las muestras correspondientes al día 0 y las del día 12 de almacenamiento en los dos lotes estudiados. Tanto en los datos de 2014 como en los de 2015, las muestras sin almacenar se ubicaron en el eje negativo de la CP1, mientras que las muestras almacenadas por 12 días se ubicaron en el eje positivo. Esta clasificación de las muestras observada en el PCA coincide con las diferencias significativas indicadas por el MANOVA entre las muestras sin almacenar y almacenadas por 12 días.

Tabla 4.8. Parámetros mecánicos de frutillas control y ozonizadas durante el almacenamiento refrigerado a 5 ± 1 °C.

Lote	Tratamiento	Día	F _R (N)	W (mJ)	D (%)	Ed (mPa)	
2014	Control	0	2,4 ± 0,9	3,8 ± 1,8	8,3 ± 2,0	19,1 ± 5,1	c,d
		4	2,7 ± 0,9	4,8 ± 2,0	11,0 ± 3,2	15,6 ± 3,7	a,b,e
		8	2,7 ± 0,8	5,2 ± 2,1	11,5 ± 2,5	15,2 ± 3,9	a,b
		12	3,0 ± 1,1	6,0 ± 2,7	13,2 ± 2,9	13,6 ± 4,0	a
	5 min O ₃	0	2,3 ± 0,8	3,4 ± 1,5	8,1 ± 2,0	18,9 ± 5,2	c,d
		4	2,8 ± 0,9	5,1 ± 2,2	9,5 ± 2,6	19,6 ± 5,4	c,d,e
		8	2,6 ± 0,7	4,6 ± 1,7	9,8 ± 2,5	17,7 ± 4,4	b,c,d,e
		12	3,0 ± 0,8	6,3 ± 2,2	12,8 ± 2,7	14,5 ± 5,1	a
	10 min O ₃	0	2,3 ± 0,8	3,7 ± 1,8	9,3 ± 1,9	16,4 ± 4,6	b,c,d,e
		4	2,7 ± 1,0	4,9 ± 2,2	9,4 ± 2,6	19,8 ± 6,1	c,d,e
		8	2,5 ± 0,8	4,6 ± 2,0	10,2 ± 2,3	15,7 ± 3,7	b,d,e
		12	3,0 ± 1,1	6,7 ± 2,5	12,7 ± 2,8	15,3 ± 5,8	a
	15 min O ₃	0	2,5 ± 1,0	4,0 ± 2,1	9,1 ± 1,8	17,7 ± 5,5	c,d,e
		4	2,8 ± 1,1	5,1 ± 2,7	9,1 ± 2,8	20,5 ± 4,3	c
		8	2,9 ± 0,9	5,6 ± 2,3	11,2 ± 2,5	16,4 ± 3,9	a,b,e
		12	3,5 ± 1,0	7,7 ± 2,5	13,0 ± 1,9	17,2 ± 3,3	a,b,e
2015	Control	0	3,1 ± 1,2	5,7 ± 3,1	8,8 ± 2,2	22,5 ± 5,2	a
		4	3,0 ± 0,9	6,0 ± 2,7	11,6 ± 2,6	17,0 ± 3,1	b
		8	3,2 ± 1,0	6,5 ± 2,9	11,8 ± 2,6	18,1 ± 3,5	b
		12	2,8 ± 0,9	5,8 ± 2,3	11,8 ± 2,1	16,8 ± 5,1	b
	5 min O ₃	0	2,9 ± 1,0	4,9 ± 2,4	8,3 ± 2,7	23,7 ± 4,5	a
		4	3,0 ± 1,0	6,0 ± 2,9	10,9 ± 3,1	19,1 ± 4,3	b
		8	2,8 ± 1,0	5,7 ± 2,8	11,5 ± 3,4	18,2 ± 5,8	b
		12	3,3 ± 1,2	7,2 ± 3,3	12,5 ± 2,7	18,0 ± 5,4	b
	10 min O ₃	0	3,2 ± 1,3	5,7 ± 3,4	8,6 ± 2,2	25,0 ± 5,1	a
		4	3,2 ± 1,0	6,6 ± 2,7	11,9 ± 2,5	18,7 ± 4,7	b
		8	2,8 ± 0,9	5,6 ± 2,5	10,7 ± 2,6	19,0 ± 4,4	b
		12	3,3 ± 0,9	6,8 ± 2,5	12,4 ± 2,6	17,6 ± 3,6	b
	15 min O ₃	0	2,6 ± 0,8	4,3 ± 1,7	7,9 ± 1,9	22,5 ± 3,9	a
		4	2,8 ± 1,0	5,3 ± 2,8	10,4 ± 2,9	19,6 ± 4,0	b
		8	3,2 ± 1,1	6,2 ± 3,0	11,0 ± 3,0	20,2 ± 5,7	b
		12	3,2 ± 1,3	7,1 ± 3,6	12,4 ± 3,1	17,7 ± 4,2	b

Promedios seguidos de distinta letra minúscula difieren significativamente ($p < 0,05$).

Tabla 4.9. Resultados del MANOVA de los parámetros mecánicos de frutillas control y ozonizadas durante el almacenamiento a 5 ± 1 °C. Lotes de 2014 y 2015.

Fuente	Estadístico		GL		F		p-valor	
	2014	2015	2014	2015	2014	2015	2014	2015
Día	0,29	0,45	3	3	48,92	82,56	<0,0001	0,0048
Tratamiento	0,04	0,02	3	3	6,08	4,36	0,0005	<0,0001
Tratamiento*Día	0,08	0,03	9	9	4,30	2,05	<0,0001	0,0318
Error			505	548				

El PCA no logró clasificar las muestras por día de almacenamiento ó por tratamiento en los días intermedios del período de almacenamiento estudiado, en concordancia nuevamente con los resultados del MANOVA. Sin embargo, se observó una tendencia de los datos de cambiar desde valores negativos hacia positivos de CP1 es decir, un corrimiento de izquierda a derecha. Este movimiento de los datos se caracterizó por una disminución de Ed y un aumento de D a lo largo del almacenamiento, indicando una menor resistencia del fruto a la deformación y una menor rigidez.

Comparando las propiedades mecánicas de los frutos sin almacenar (día 0) correspondientes a los dos lotes estudiados, podemos observar que los frutos cosechados en 2014 presentaron menores valores de F_R y Ed que los cosechados en 2015, indicando una menor resistencia a la punción de la epidermis y tejidos menos rígidos. La clasificación de las muestras de acuerdo al año de cosecha fue posibilitada por la CP2, donde los datos de 2014 se ubicaron en valores negativos y los de 2015 en valores positivos. A pesar de las diferentes condiciones de partida de las frutos cosechados en 2014 y 2015, los cambios en los parámetros mecánicos durante el almacenamiento fueron similares en las muestras tratadas y control. Estos resultados concuerdan con los publicados por Aday y col. (2014), quienes reportaron no haber encontrado diferencias significativas en la firmeza de frutillas control y ozonizadas durante el almacenamiento, habiendo evaluado diferentes concentraciones de ozono (0,075 - 0,15 mg.L⁻¹) y tiempos de tratamiento (2 y 5 min).

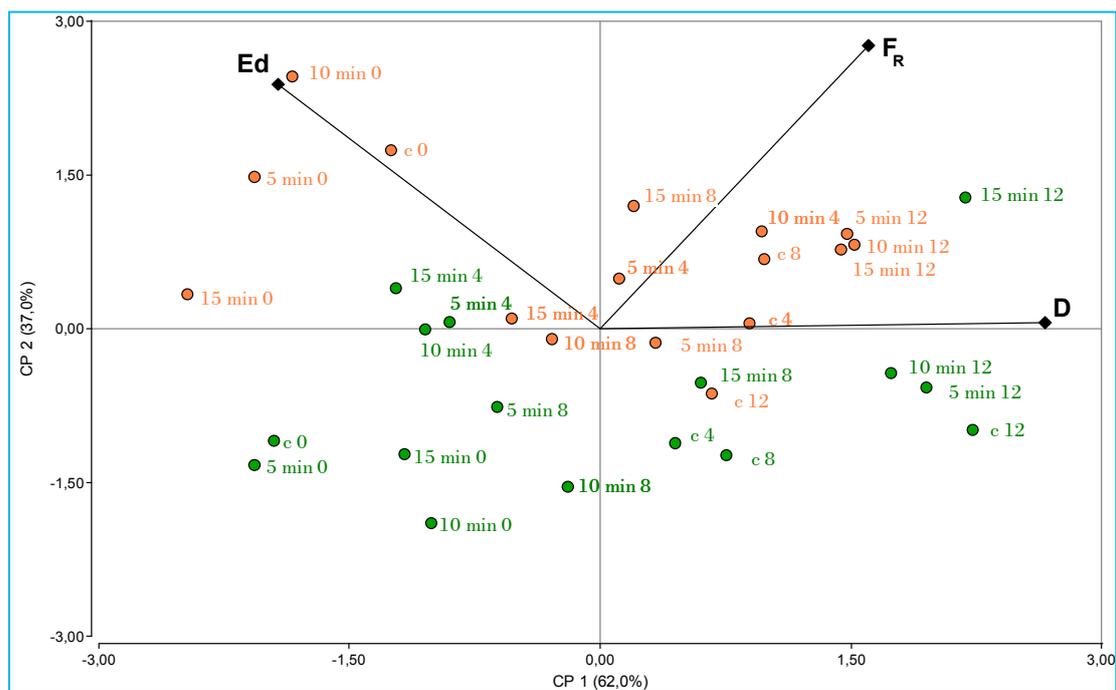


Figura 4.11. Análisis de Componentes Principales de los parámetros mecánicos de frutillas tratadas y control durante el almacenamiento refrigerado a $5 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$, correspondientes a los lotes de 2014 y 2015. (♦) 2014, (◆) 2015.

4.1.1.6 Efecto del tratamiento con ozono sobre la micro y la ultraestructura

4.1.1.6.1 Microscopía óptica (MO)

En las **Figuras 4.12** y **4.13** se presentan las micrografías correspondientes a frutillas control y ozonizadas durante 5 y 15 min, al día 0 y 8 de almacenamiento, respectivamente.

Las micrografías del tejido de los frutos control sin almacenar (día 0) mostraron una primera capa de células epidérmicas pequeñas, con estrecho contacto entre sí (**Figura 4.12 A-C**). Las células epidérmicas presentaron en algunas partes una morfología cuadrangular, rectangular ó irregular, y en algunas zonas aparecieron con forma alargada; se observaron citoplasmas parietales y vacuolas turgentes con gran cantidad de antocianinas que se presentaron en forma de grandes y pequeños glóbulos esféricos. La membrana cuticular (CM) presentó un contorno ondulado bien definido; en algunas regiones se observó separada de las células epidérmicas. Hacia zonas cercanas a las células epidérmicas, la capa péctica y la capa no cutinizada presentaron una transición desde incoloro a una tonalidad púrpura tenue que se intensificó al llegar a la pared celular (**Figura 4.12 B-C**). El grosor de la pared tangencial externa (OTW) resultó mayor

respecto a la pared tangencial interna (ITW) y a la pared radial (RW). Además, presentó una tinción más intensa que la ITW, en ambos casos de coloración púrpura (**Figura 4.12 B**).

Debajo de las células epidérmicas se observó una capa discontinua de grandes células subepidérmicas con paredes delgadas, de morfología y tamaño irregular, turgentes con citoplasma parietal y algunos depósitos de antocianinas. El tamaño, forma y puntos de contacto intercelular en la región subepidérmica mostró una marcada transición desde una tipología epidérmica hasta presentar características correspondientes al conocarpo. El conocarpo estaba formado por células de gran y mediano tamaño, redondeadas o de forma irregular con grandes espacios intercelulares entre sí (**Figura 4.12 A**).

Las micrografías obtenidas en el día 0 del tejido de los frutos expuestos a ozono durante 5 y 15 min (**Figura 4.12 D-F** y **G-I**, respectivamente) mostraron una tinción más intensa de la CM y de la región interna de la OTW respecto al control. Se observaron conglomerados de antocianinas en las células epidérmicas más pequeños y con una tinción levemente diferente a los descritos en el control. Algunas células subepidérmicas se presentaron plegadas y con contornos angulosos (**Figura 4.12 E, F, H, I**). Las muestras ozonizadas durante 15 min presentaron una leve contracción del tejido subepidérmico y células adyacentes con señales de incipiente plasmólisis (**Figura 4.12 H, I**). No se observaron cambios significativos en el arreglo de las células del conocarpo de las muestras ozonizadas (**Figura 4.12 D, G**).

Luego de 8 días de almacenamiento, la OTW y las paredes de las células subepidérmicas del control presentaron una tinción similar al control sin almacenar (**Figura 4.13 A**). Los glóbulos de antocianinas en las células epidérmicas tendieron a unirse y su tinción fue diferente a la observada en el control fresco. Sólo algunas células epidérmicas presentaron paredes con interrupciones, mientras que numerosas células subepidérmicas mostraron membranas colapsadas (**Figura 4.13 A**). Al día 12 de almacenamiento, la OTW tomó una coloración púrpura oscura debido a la compactación de las células epidérmicas con citoplasmas y vacuolas colapsadas (**Figura 4.13 B**). En algunos sitios se visualizaron interrupciones y desorganización de la epidermis (**Figura 4.13 D**).

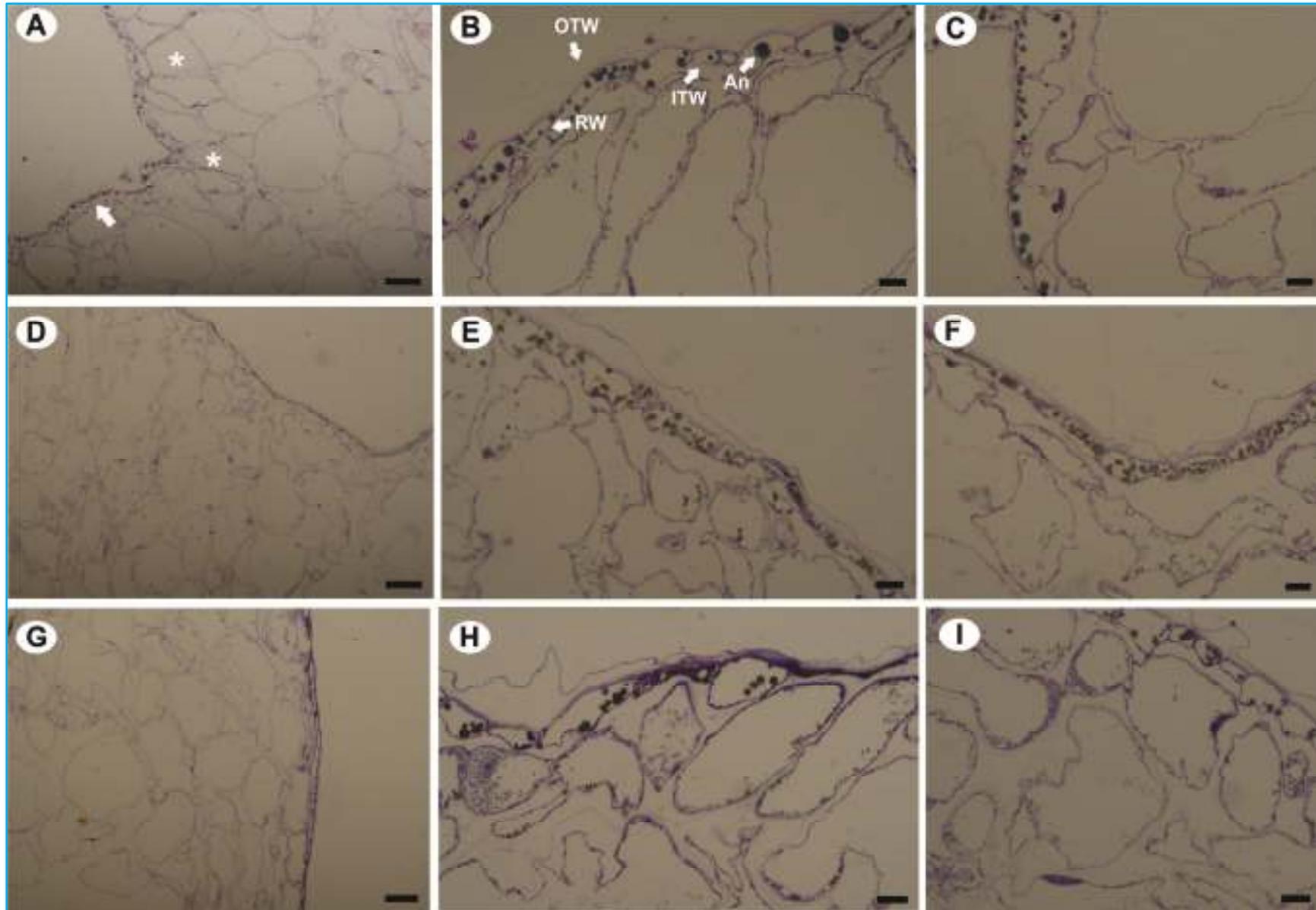


Figura 4.12. Imágenes de microscopía óptica de frutillas control y ozonizadas obtenidas al día 0 de almacenamiento, correspondientes al lote de 2015. (A-C) Control, (D-F) 5 min O₃, (G-I) 15 min O₃. Escalas: A, D, G, 100 μm; B, C, E, F, H, I, 20 μm. OTW (pared tangencial externa), ITW (pared tangencial interna), An (antocianina), RW (pared radial). La flecha blanca indica las células epidérmicas; el asterisco blanco muestra las células subepidérmicas.

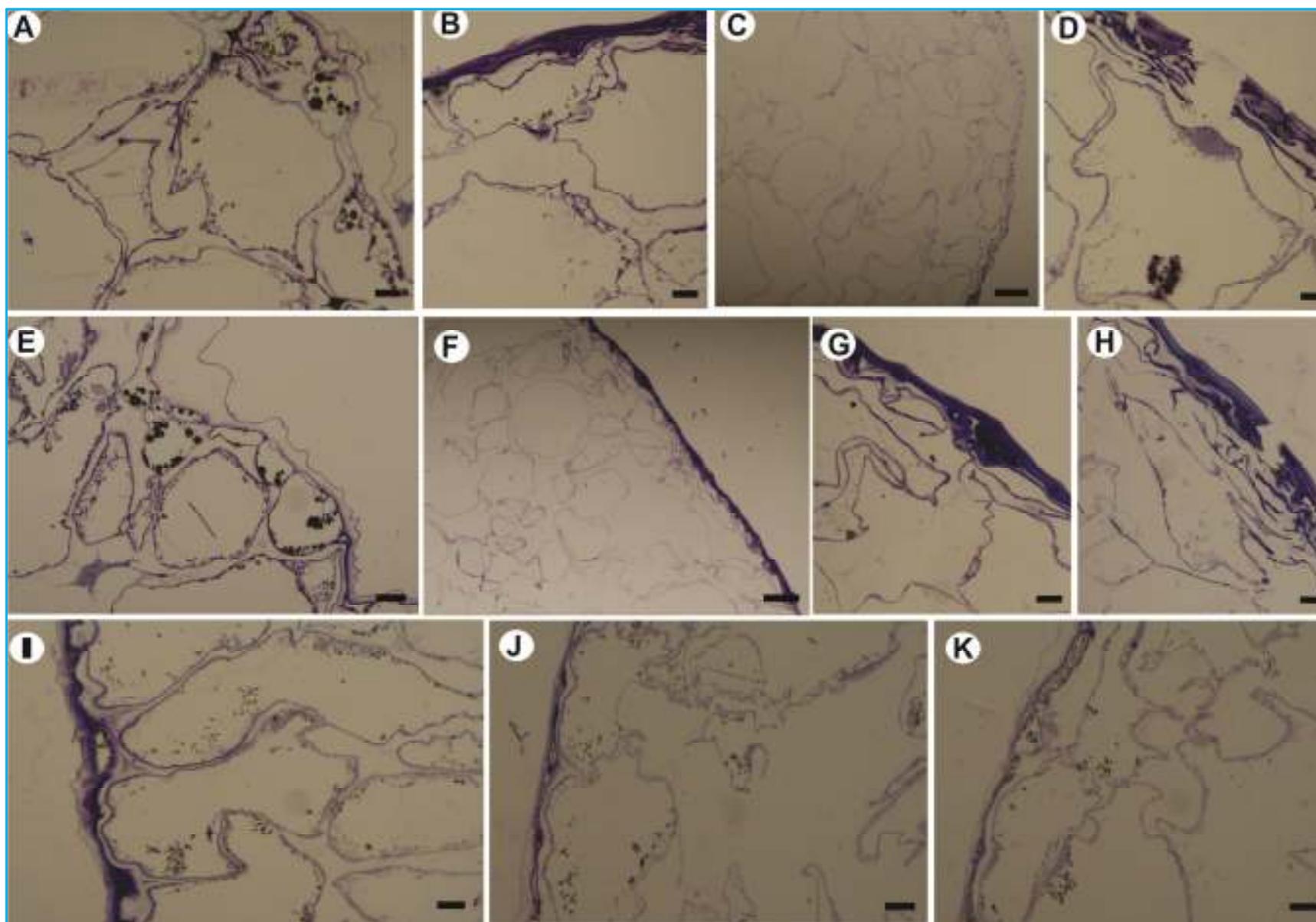


Figura 4.13. Imágenes de microscopía óptica de frutillas control y ozonizadas a los días 8 y 12 de almacenamiento a 5 ± 1 °C, correspondientes al lote de 2015. (A) Control, día 8; (B-D) control, día 12; (E) 5 min O_3 , día 8; (F-H) 5 min O_3 , día 12; (I-K) 15 min O_3 , día 8. Escalas: A, B, D, E, G-K, 20 μm ; C, F, 100 μm .

El almacenamiento prolongado ocasionó cambios severos en las células del conocarpo: en algunas se observaron paredes rotas, pérdida de forma, reducción del grado de contacto intercelular y de los espacios extracelulares, como así también el colapso severo de algunas células (**Figura 4.13 C**).

Las imágenes del tejido de los frutos ozonizados 5 min y almacenados 8 días mostraron una CM ondulada y bien delimitada, en algunas zonas separada de las capas subyacentes. Las células epidérmicas presentaron diversos tamaños y formas, con paredes intensamente teñidas (**Figura 4.13 E**). Al igual que lo observado en el control, la OTW sufrió una compactación severa y tomó una coloración púrpura intensa luego de 12 días de almacenamiento (**Figura 4.13 F, G**). También se observaron algunas fisuras de la epidermis (**Figura 4.13 H**) pero, en general, el tejido se vio mejor conservado que en el caso del control. Las células del conocarpo presentaron forma redondeada con espacios extracelulares considerables (**Figura 4.13 F**).

Por el contrario, los frutos ozonizados 15 min y almacenados durante 8 días mostraron células subepidérmicas totalmente colapsadas y plegadas, y una compactación tangencial generalizada de la epidermis (**Figura 4.13 I-K**). Hacia el interior del conocarpo se encontraron células con evidente plasmólisis, colapsadas, restos de pared celular y grandes espacios extracelulares (**Figura 4.13 J**).

4.1.1.6.2 Microscopía electrónica de transmisión (MET)

Las imágenes obtenidas mediante MET de frutillas control y ozonizadas a los 0 y 8 días de almacenamiento se presentan en la **Figura 4.14**. En las observaciones con MET del tejido del fruto control sin almacenar (día 0), se pudieron identificar las diferentes capas que componen la OTW, que se enumeran a continuación desde afuera hacia adentro:

- Ceras epicuticulares (ew)
- Membrana cuticular (CM): incluye la cutícula (compuesta por cutina) y la capa cutinizada (compuesta por cutina, ceras intracelulares y polisacáridos)
- Capa péctica (pl, compuesta por polisacáridos pécticos)
- Capa no-cutinizada (cl, compuesta principalmente por microfibrillas de celulosa, xiloglucanos y polisacáridos pécticos)

Las ceras epicuticulares aparecieron en la superficie formando una delgada capa con algunas discontinuidades, con un contorno sinuoso y electrodenso (**Figura 4.14 A**,

B). Sin embargo, debe tenerse en cuenta que la preparación de las muestras para las observaciones MET puede causar alteraciones en las ceras. La CM se observó bien definida, con una capa cutinizada electrodensa de estructura reticulada y contorno irregular. La capa cutinizada presentó numerosas ramificaciones que penetraron la cutina propiamente dicha. Una capa delgada de polisacáridos pécticos marcaron una transición abrupta entre la CM y la capa no cutinizada (**Figura 4.14B**).

La capa celulósica de la OTW presentó una densidad electrónica menor que la CM, con la región interna con mayor densidad electrónica, lo cual coincide con la intensa tinción observada en MO.

Las microfibrillas de celulosa mostraron un patrón claramente longitudinal (**Figura 4.14 B**). Las imágenes obtenidas por MET al día 8 de almacenamiento mostraron una OTW con ultraestructura similar a la del control fresco, con un marco longitudinal de microfibrillas de celulosa en la capa no cutinizada y en la ITW, aunque con una densidad electrónica levemente menor (**Figura 4.14 C**). La CM se observó reticulada y con menor densidad electrónica, ligeramente menor respecto al día 0 (**Figura 4.14 D**).

En el caso de las muestras ozonizadas durante 5 y 15 minutos (**Figura 4.14 E, F y I, J**, respectivamente), las observaciones por MET mostraron la CM, RW y la región interna de las células epidérmicas con buena densidad electrónica. Las ceras epicuticulares se visualizaron como una capa continua bien definida y levemente separada de la CM (**Figura 4.14 F, J**). Luego de 8 días de almacenamiento, los frutos ozonizados durante 5 min presentaron la CM, las paredes radiales y la capa no cutinizada con mayor densidad electrónica que en el caso del control almacenado o la fruta ozonizada 5 min antes del almacenamiento (**Figura 4.14 G, H**). La capa no cutinizada mostró un marcado empaquetamiento de polisacáridos, reticulado en la parte externa y longitudinal en la parte interna. Las paredes radiales se caracterizaron también por material fibrilar densamente empaquetado y entre éste, una visible laminilla media (**Figura 4.14 G**).

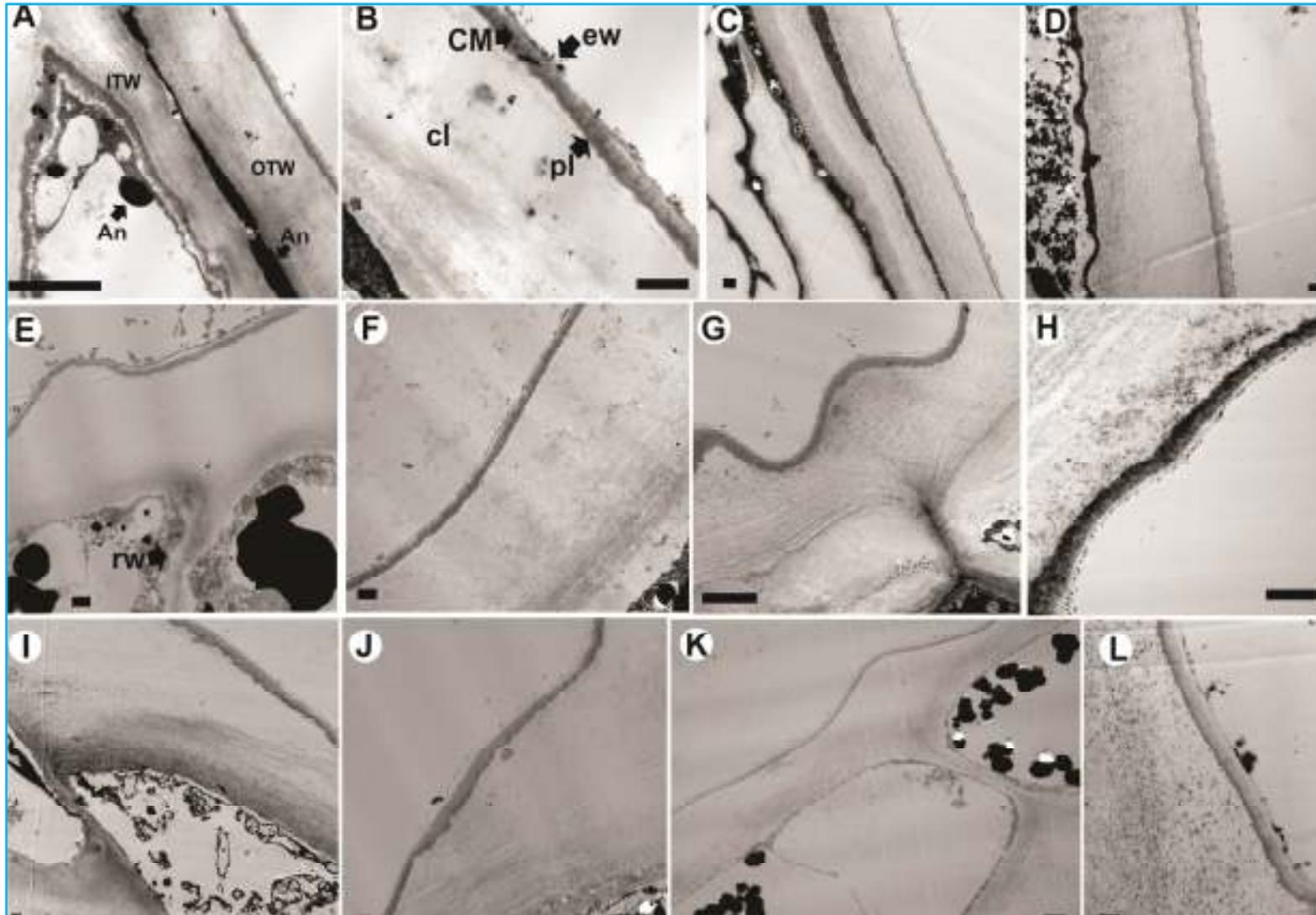


Figura 4.14. Imágenes de MET de fresas control y ozonizadas almacenadas a 5 ± 1 °C. Micrografías correspondientes al lote de 2015. (A, B) Control, día 0; (C, D) Control, día 8; (E, F) 5 min O₃, día 0; (G-H) 5 min O₃, día 8; (I-J) 15 min O₃, día 0; (K-L) 15 min O₃, día 8. Escalas: A, 5 μ m; B, H, K, 2 μ m; C, E, F, I, J, 1 μ m; G, 6 μ m; D, L, 0,5 μ m. OTW (pared tangencial externa); ITW (pared tangencial interna); An (antocianina); RW (pared epidérmica radial); CM (membrana cuticular); pl (capa péctica); cl (capa celulósica).

La CM se visualizó más gruesa ($\sim 1,2 \mu\text{m}$) respecto al control ($\sim 0,6 \mu\text{m}$) y con un reticulado muy denso (**Figura 4.14 H**). Por el contrario, los frutos ozonizados durante 15 min y almacenados 8 días mostraron su CM, RW y capa no cutinizada con menor densidad electrónica respecto al día 0 y una ultraestructura en general muy similar al control almacenado, aunque con una CM levemente más fina ($\sim 0,5 \mu\text{m}$) (**Figura 4.14 K, L**). Se visualizó además la laminilla media en la RW (**Figura 4.14 K**).

4.1.1.7 Efecto del tratamiento con ozono sobre los parámetros fisicoquímicos

En la **Tabla 4.10** se presentan los valores de los parámetros fisicoquímicos correspondientes a los frutos control y ozonizados durante el almacenamiento. Los resultados del ANOVA se presentan en la **Tabla 4.11**. El análisis estadístico de las variables evaluadas indicó que la interacción entre los factores "tratamiento" y "tiempo de almacenamiento" no fue significativa en el caso de la acidez, pH y humedad (Acidez: $F_{9, 32} = 1,00$, $p = 0,4630$; pH: $F_{9, 32} = 1,09$, $p = 0,3957$; Humedad: $F_{9, 32} = 1,87$, $p = 0,0941$); por lo que estas propiedades fueron evaluadas mediante los efectos principales de los factores. En el caso del contenido de sólidos solubles la interacción entre los factores resultó significativa ($^{\circ}\text{Brix } F_{9, 32} = 2,5$, $p = 0,0291$) (**Tabla 4.11**).

El ácido cítrico representa alrededor del 90 % de la acidez titulable en las frutillas, mientras que el contenido de sólidos solubles está relacionado con el contenido de azúcares solubles, entre los que predominan fructosa, glucosa y sacarosa (Cordenunsi y col., 2003).

En el caso de la acidez, no se observó un efecto significativo del tratamiento, pero sí lo fue el efecto del tiempo de almacenamiento (**Tabla 4.11**). Se observó una leve disminución de la acidez al día 4 de almacenamiento en todas las muestras y, posteriormente, un aumento significativo, alcanzando niveles que no difirieron significativamente a los correspondientes al día 0 (**Tabla 4.10**).

En cuanto al pH, los efectos principales del tratamiento y del tiempo de almacenamiento resultaron significativos (**Tabla 4.11**). En general, se observó un leve aumento del pH con el incremento del tiempo de exposición de las muestras al ozono, que sólo resultó significativo para el mayor tiempo de tratamiento (15 min). En cuanto al efecto del almacenamiento, no se observaron cambios marcados ni con una tendencia definida en los valores de pH con el transcurso del tiempo, aunque el leve aumento del pH observado en el octavo día de almacenamiento resultó significativamente diferente al resto de los días evaluados (**Tabla 4.10**).

Por otro lado, no se observó un efecto significativo del tratamiento o del tiempo de almacenamiento sobre el contenido de humedad de las muestras (**Tabla 4.10 y 4.11**). En cuanto al contenido de sólidos solubles, los frutos control mostraron una leve disminución durante el almacenamiento que no resultó significativa. Los frutos expuestos a ozono mostraron un leve incremento significativo en el contenido de sólidos solubles en algunos períodos del almacenamiento, tal es el caso de los frutos tratados por 5 min al día 4 y los tratados durante 15 min al día 8. Sin embargo, luego de esos valores máximos, el contenido de sólidos solubles de todas las muestras disminuyó en los días subsiguientes de almacenamiento, permaneciendo en valores superiores al control pero que no fueron significativos.

En la literatura se han reportado resultados contradictorios respecto al efecto de diferentes dosis de ozono en fase acuosa sobre las propiedades fisicoquímicas de frutillas; incluso se han observado diferentes tendencias en función del cultivar de frutillas empleado (Cordenunsi y col., 2003). de Souza Ferreira y col. (2017) observaron que los valores de sólidos solubles en frutillas cv. Portola ozonizadas en agua destilada a pH 3,0 y pH 8,7 durante 5 min (0,11 y 0,04 mg.L⁻¹) permanecieron sin variaciones significativas a lo largo del almacenamiento refrigerado, a diferencia de las muestras control que presentaron una disminución significativa. Aday y col. (2014) observaron también, que la exposición de frutillas cv. Camarosa al ozono en fase acuosa (0,075 y 0,15 mg.L⁻¹ durante 2 y 5 min), permitió mantener el contenido de sólidos solubles en niveles mayores a los de las muestras control, como así también reducir el incremento del pH durante el almacenamiento a 4 °C. Por el contrario, Alexander y col. (2012) no encontraron un efecto significativo del tratamiento con ozono (0,3 mg.L⁻¹-2 min; 80 g fruta en 30 L de agua) sobre los valores de pH de frutillas cv. Camarosa.

Tabla 4.10. Parámetros fisicoquímicos de frutillas control y ozonizadas durante el almacenamiento a 5 ± 1 °C.

Tratamiento	Tiempo de almacenamiento (día)				Promedio
	0	4	8	12	
Control	0,89 ± 0,06	0,87 ± 0,07	0,98 ± 0,06	0,93 ± 0,13	0,92 ± 0,08 ns
5 min O ₃	0,90 ± 0,09	0,89 ± 0,06	0,88 ± 0,09	0,94 ± 0,02	0,90 ± 0,06 ns
10 min O ₃	0,95 ± 0,01	0,83 ± 0,03	0,93 ± 0,01	0,97 ± 0,06	0,92 ± 0,06 ns
15 min O ₃	0,86 ± 0,02	0,81 ± 0,11	0,93 ± 0,01	0,98 ± 0,03	0,89 ± 0,09 ns
Promedio	0,90 ± 0,06 A, B	0,85 ± 0,07 A	0,93 ± 0,06 b	0,96 ± 0,07 B	

pH

Tratamiento	Tiempo de almacenamiento (día)				Promedio
	0	4	8	12	
Control	3,40 ± 0,03	3,35 ± 0,06	3,52 ± 0,06	3,34 ± 0,02	3,40 ± 0,08 a
5 min O ₃	3,39 ± 0,10	3,44 ± 0,08	3,55 ± 0,04	3,38 ± 0,04	3,44 ± 0,09 a
10 min O ₃	3,45 ± 0,16	3,39 ± 0,01	3,55 ± 0,06	3,44 ± 0,03	3,46 ± 0,10 a, b
15 min O ₃	3,60 ± 0,03	3,41 ± 0,11	3,60 ± 0,08	3,50 ± 0,05	3,53 ± 0,10 b
Promedio	3,46 ± 0,12 A	3,40 ± 0,07 A	3,55 ± 0,06 B	3,42 ± 0,07 A	

Humedad (% base húmeda)

Tratamiento	Tiempo de almacenamiento (día)				Promedio
	0	4	8	12	
Control	88,9 ± 0,6	89,6 ± 0,5	89,8 ± 0,5	89,5 ± 1,2	89,5 ± 0,7 NS
5 min O ₃	89,8 ± 0,8	88,3 ± 0,9	89,6 ± 0,2	88,9 ± 0,9	89,1 ± 0,9 NS
10 min O ₃	88,9 ± 1,1	89,4 ± 0,4	89,3 ± 0,4	87,8 ± 0,7	88,9 ± 0,9 NS
15 min O ₃	89,5 ± 1,1	89,8 ± 0,7	88,4 ± 1,5	88,8 ± 0,4	89,2 ± 1,0 NS
Promedio	89,3 ± 0,9 NS	89,3 ± 0,8 NS	89,3 ± 0,9 NS	88,8 ± 0,9 NS	

Sólidos solubles (°Brix)

Tratamiento	Tiempo de almacenamiento (día)			
	0	4	8	12
Control	9,1 ± 0,6 ab	8,8 ± 0,7 ab	8,3 ± 0,3 a	8,3 ± 0,6 a
5 min O ₃	8,6 ± 0,6 a	10,0 ± 1,2 b	9,1 ± 0,1 ab	9,0 ± 0,7 ab
10 min O ₃	8,9 ± 0,8 ab	8,5 ± 0,1 a	9,0 ± 0,2 ab	9,4 ± 0,2 ab
15 min O ₃	9,0 ± 0,5 ab	8,2 ± 0,2 a	9,9 ± 1,4 bc	8,8 ± 0,2 ab

Los valores fueron expresados como promedio de cada tratamiento ± desviación estándar. NS: efecto principal no significativo. Los tratamientos seguidos de distinta letra minúscula difieren significativamente ($p < 0,05$). Los días de almacenamiento seguidos de distinta letra mayúscula difieren significativamente ($p < 0,05$).

Tabla 4.11. Resultados del ANOVA de los parámetros fisicoquímicos obtenidos de frutillas control y ozonizadas durante el almacenamiento refrigerado.

Fuente	CM	GL	F	p-valor
<i>Acidez</i>				
Día	0,0245	3	5,81	0,0028
Tratamiento	0,0020	3	5,81	0,7075
Tratamiento*Día	0,0042	9	1,00	0,4630
Error	0,0042	32		
R^2_{aj}	0,21			
<i>pH</i>				
Día	0,0599	3	11,9417	<0,0001
Tratamiento	0,0321	3	6,3969	0,0016
Tratamiento*Día	0,0055	9	1,0920	0,3957
Error	0,0050	32		
R^2_{aj}	0,51			
<i>Humedad</i>				
Día	0,8867	3	1,3190	0,2853
Tratamiento	0,7051	3	1,0489	0,3844
Tratamiento*Día	1,2542	9	1,8658	0,0941
Error	0,6722	32		
R^2_{aj}	0,43			
<i>° Brix</i>				
Día	0,0874	3	0,2072	0,8906
Tratamiento	0,6167	3	1,4622	0,2433
Tratamiento*Día	1,0402	9	2,4657	0,0291
Error	0,4219	32		
R^2_{aj}	0,46			

4.1.1.8 *Efecto del tratamiento con ozono sobre el contenido de compuestos bioactivos y la capacidad antioxidante*

4.1.1.8.1 Puesta a punto del método de extracción

La bibliografía existente respecto a metodologías de extracción de compuestos bioactivos en diferentes matrices, y en particular en frutillas, es abundante. Con el fin de maximizar los rendimientos en cuanto a la extracción de antocianinas y compuestos fenólicos totales en frutillas, se han evaluado distintas mezclas extractoras, como así también diferentes metodologías de extracción y de separación de dichos compuestos (Navas y col., 2012; Herrera y col., 2004; Canuto y col., 2016).

En este trabajo se decidió evaluar el método de extracción asistida por ultrasonido para extraer los compuestos bioactivos presentes en las diferentes muestras de frutilla, utilizando una mezcla extractora de etanol – ácido clorhídrico (0,1 N) (85:15 v/v). Para optimizar las condiciones de extracción con el fin de obtener un único extracto que pudiera utilizarse para determinar el contenido de antocianinas, compuestos fenólicos y capacidad antioxidante, se evaluaron distintos volúmenes de mezcla de extracción y diferentes condiciones de sonicación. Para la optimización de las condiciones de extracción se utilizó un diseño de superficies de respuesta. Se optó por un diseño factorial de 3^3 aumentado en 8 puntos centrales; cada condición se realizó por duplicado. En la **Tabla 4.12** se presentan las variables independientes y los niveles respectivos empleados en el diseño.

Tabla 4.12. Variables independientes y sus niveles (naturales y codificados).

Variable independiente	Niveles naturales			Niveles codificados		
Volumen de solvente (ml)	50	75	100	-1	0	1
Amplitud de onda (%)	20	40	60	-1	0	1
Tiempo de sonicación (min)	5	10	15	-1	0	1

Los resultados experimentales fueron modelados mediante un polinomio de segundo grado como se muestra en la **Ecuación 4.1**.

$$Y = b_0 + b_1X_1 + b_2X_2 + b_3X_3 + b_{11}X_1^2 + b_{22}X_2^2 + b_{33}X_3^2 + b_{12}X_1X_2 + b_{13}X_1X_3 + b_{23}X_2X_3 \quad (\text{Ec.4.1})$$

donde: Y representa la variable respuesta, y X_1 , X_2 , X_3 representan las variables independientes (volumen de solvente, amplitud y tiempo de sonicación). Los valores b_n corresponden a los coeficientes resultantes de la regresión.

En las **Tablas 4.13** y **4.14** se presentan los resultados obtenidos para el contenido de antocianinas, compuestos fenólicos totales y capacidad antioxidante (determinada por el método TEAC) para cada combinación de factores y para las repeticiones del punto central, respectivamente.

Los resultados del modelado indicaron que el efecto principal del tiempo de sonicación en las tres variables respuestas evaluadas no resultó significativo. Sin embargo, en el caso de la capacidad antioxidante el término cuadrático de dicho factor fue significativo. Las interacciones V_{Solvente} - Tiempo, Amplitud - Tiempo y el término cuadrático del factor Amplitud tampoco tuvieron un efecto significativo, por lo cual fueron eliminados del modelado y de la posterior optimización de las variables de respuesta. En la **Tabla 4.15** se presentan los coeficientes obtenidos de cada modelo y los resultados del análisis de varianza correspondiente.

En la **Figura 4.15** se presentan las superficies de respuesta obtenidas al representar las funciones obtenidas del ajuste. Para la representación gráfica de las variables respuesta, el factor tiempo de sonicación se mantuvo constante en el valor optimizado, que resultó de 15 min. La función matemática representada en cada superficie corresponde a la expresión matemática presentada en la **ecuación 4.1**, reemplazando los coeficientes por los valores especificados en la **Tabla 4.15**.

La optimización de las variables respuestas fue realizada mediante la maximización de la función "Deseabilidad", representada en la **Figura 4.16 a-b**. Las condiciones de extracción que establecieron el máximo de deseabilidad se resumen en la **Tabla 4.16**.

Tabla 4.13. Contenido de antocianinas, compuestos fenólicos totales y capacidad antioxidante obtenidos con las diferentes variables de extracción.

Volumen de solvente (ml)	Amplitud (%)	Tiempo (min)	Antocianinas (mgPg3/100g)	Polifenoles (mg AG/100g)	TEAC (mg Trolox/100g)
50	60	15	29,5 ± 2,9	247,4 ± 16,4	3,94 ± 0,12
		10	28,4 ± 2,6	232,0 ± 15,3	3,68 ± 0,43
		5	27,9 ± 3,2	247,4 ± 19,4	3,60 ± 0,17
	40	15	27,9 ± 1,7	223,6 ± 3,7	3,80 ± 0,22
		10	25,8 ± 1,9	235,9 ± 0,4	3,56 ± 0,22
		5	28,0 ± 2,9	230,2 ± 12,5	3,45 ± 0,09
	20	15	22,9 ± 2,3	231,4 ± 19,3	3,20 ± 0,06
		10	25,3 ± 0,2	210,4 ± 2,8	3,39 ± 0,10
		5	24,1 ± 0,1	203,4 ± 6,0	3,35 ± 0,05
75	60	15	28,7 ± 1,7	264,3 ± 8,6	3,73 ± 0,19
		10	28,6 ± 0,7	281,0 ± 22,5	3,82 ± 0,18
		5	29,3 ± 2,3	272,7 ± 10,8	3,98 ± 0,22
	40	15	28,9 ± 3,0	252,4 ± 8,9	3,76 ± 0,12
		10	28,8 ± 3,1	244,8 ± 3,3	3,65 ± 0,04
		5	27,8 ± 1,3	247,7 ± 11,9	3,83 ± 0,18
	20	15	28,9 ± 0,5	225,2 ± 2,1	3,68 ± 0,14
		10	28,3 ± 0,6	225,2 ± 26,8	3,98 ± 0,14
		5	28,2 ± 1,6	225,8 ± 3,6	3,35 ± 0,10
100	60	15	29,2 ± 2,0	264,2 ± 7,3	3,81 ± 0,21
		10	27,0 ± 0,9	269,9 ± 20,2	3,72 ± 0,21
		5	28,2 ± 1,4	262,0 ± 18,7	3,82 ± 0,15
	40	15	29,4 ± 0,4	306,5 ± 16,0	3,89 ± 0,11
		10	28,8 ± 0,8	264,1 ± 16,3	3,55 ± 0,23
		5	28,7 ± 2,2	241,2 ± 12,1	3,36 ± 0,11
	20	15	28,3 ± 1,6	262,3 ± 12,5	3,65 ± 0,08
		10	28,3 ± 07	253,3 ± 7,0	3,61 ± 0,01

Los valores fueron expresados como promedio de cada condición ± desviación estándar.

Tabla 4.14. Resultados experimentales correspondientes al punto central del diseño.

Volumen de solvente (ml)	Amplitud (%)	Tiempo (min)	Antocianinas (mgPg3/100g)	Polifenoles (mg AG/100g)	TEAC (mg Trolox/100g)
75	40	10	31,0 ± 4,5	260,9 ± 8,2	3,34 ± 0,15
			28,7 ± 2,1	241,1 ± 10,3	4,16 ± 0,58
			31,3 ± 0,3	224,0 ± 13,1	4,15 ± 0,24
			28,0 ± 1,7	210,2 ± 19,4	4,27 ± 0,51
			28,1 ± 2,5	223,3 ± 11,9	4,49 ± 0,02
			28,6 ± 1,5	227,6 ± 17,4	3,88 ± 0,03
			30,2 ± 2,1	238,8 ± 20,2	4,46 ± 0,10
			26,9 ± 0,3	211,7 ± 8,9	4,02 ± 0,43

Los valores se expresaron como promedio ± desviación estándar.

Tabla 4.15. Efectos significativos de los factores y sus correspondientes coeficientes de regresión.

Antocianinas				
Factor	Coefficiente	Valor estimado	F_{1, 62}	p-valor
	b ₀	28,681		
V _{Solvente} (X ₁)	b ₁	1,054	15,24	0,0002
Amplitud (X ₂)	b ₂	0,635	5,52	0,0220
Tiempo (X ₃)	b ₃	0,023	0,01	0,9337
X ₁ ²	b ₁₁	-1,135	7,74	0,0072
X ₁ X ₂	b ₁₂	-1,384	17,52	0,0001
X ₃ ²	b ₃₃	0,256	0,39	0,5328

Compuestos fenólicos totales				
Factor	Coefficiente	Valor estimado	F_{1, 62}	p-valor
	b ₀	238,50		
V _{Solvente} (X ₁)	b ₁	17,93	31,73	0,0001
Amplitud (X ₂)	b ₂	13,50	17,98	0,0001
Tiempo (X ₃)	b ₃	4,78	2,25	0,1385
X ₁ ²	b ₁₁	3,60	0,56	0,4566
X ₁ X ₂	b ₁₂	-5,16	1,75	0,1908
X ₃ ²	b ₃₃	7,36	2,34	0,1311

Capacidad antioxidante (TEAC)				
Factor	Coefficiente	Valor estimado	F_{1, 62}	p-valor
	b ₀	4,045		
V _{Solvente} (X ₁)	b ₁	0,043	0,87	0,3537
Amplitud (X ₂)	b ₂	0,141	9,29	0,0034
Tiempo (X ₃)	b ₃	0,077	2,77	0,1011
X ₁ ²	b ₁₁	-0,324	21,41	0,0001
X ₁ X ₂	b ₁₂	-0,044	0,61	0,4361
X ₃ ²	b ₃₃	-0,188	7,26	0,0091

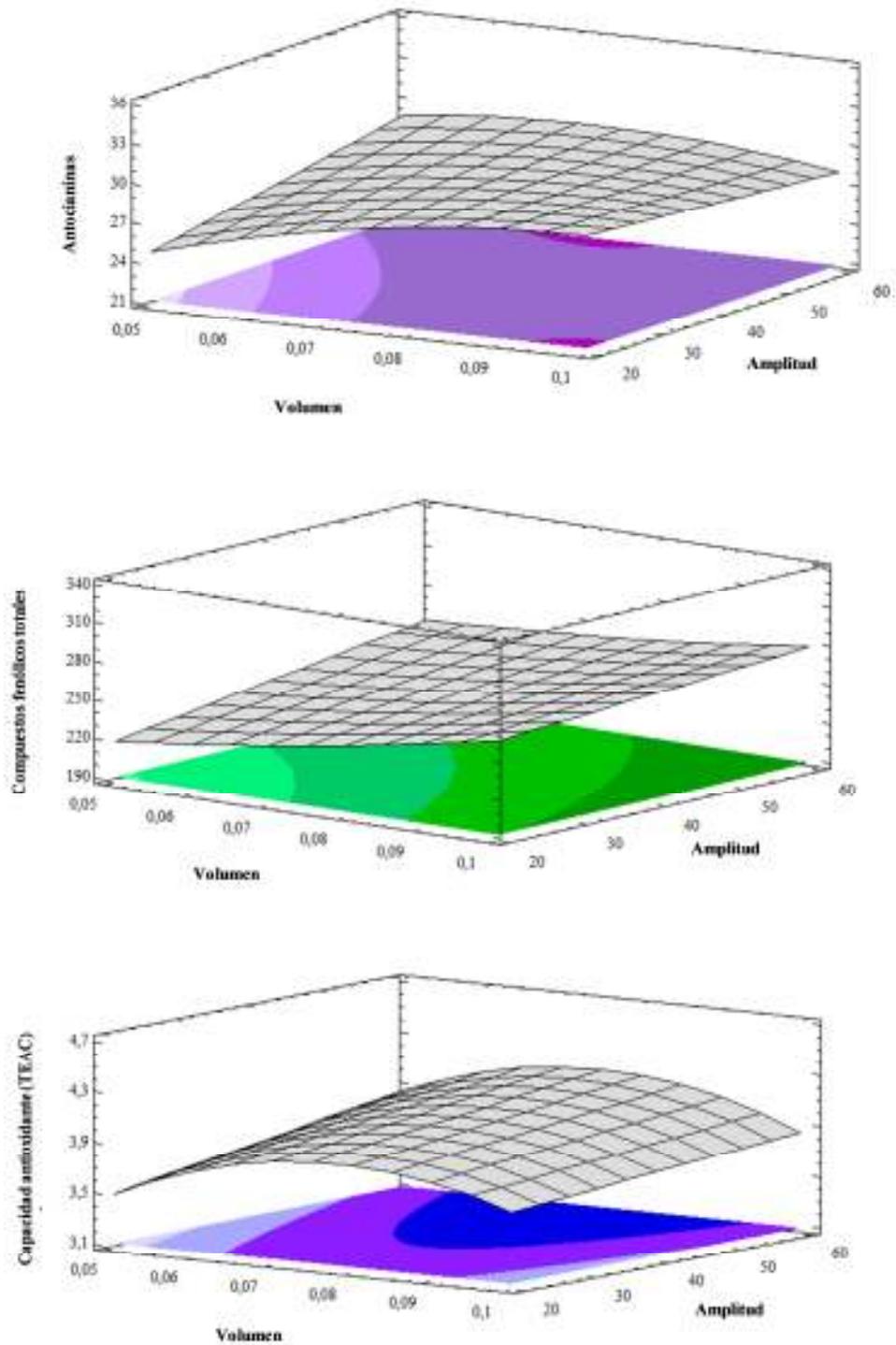
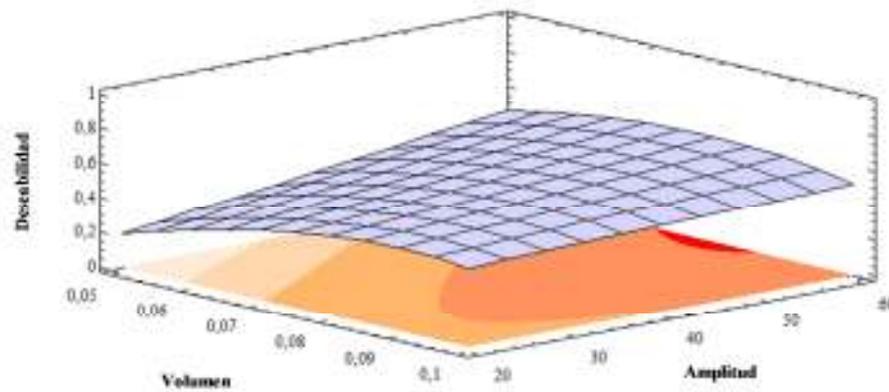


Figura 4.15. Superficies de respuesta obtenidas del ajuste de los datos del contenido de antocianinas, compuestos fenólicos totales y capacidad antioxidante. Las gráficas corresponden a un tiempo de sonicación de 15 min.

(a)



(b)

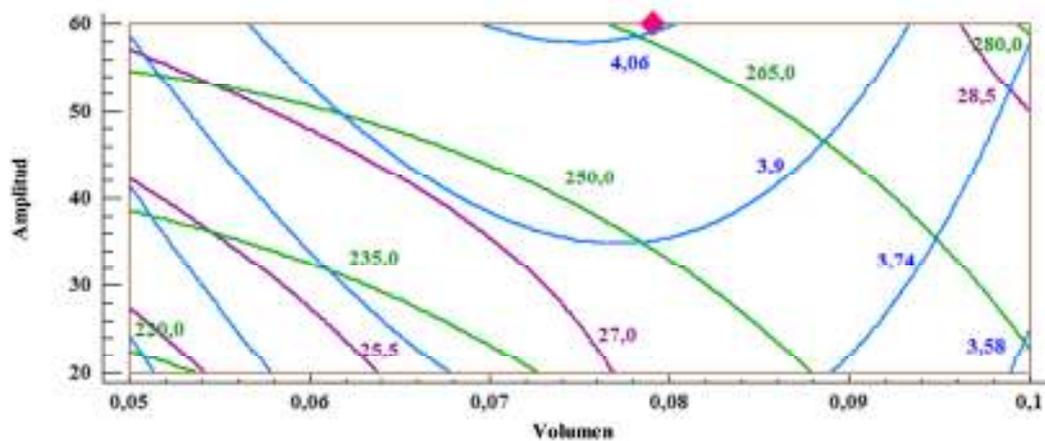


Figura 4.16. Función deseabilidad (a) y gráfico de contornos (b). (—) Contenido de anocianinas, (—) Compuestos fenólicos totales, (—) TEAC, (♦) Condiciones de extracción óptimas. Las gráficas corresponden a un tiempo de sonicación de 15 min.

Tabla 4.16. Optimización de las variables de respuesta.

Factor	Óptimo
Volumen de solvente (ml)	78,99 ≈ 80
Amplitud de onda (%)	60
Tiempo de sonicación (min)	15

Se realizó un último ensayo que consistió en realizar las determinaciones de anocianinas, compuestos fenólicos y capacidad antioxidante en las condiciones de extracción optimizadas y comparar los valores experimentales con los predichos por el mode-

lo, supuestos máximos. Los resultados obtenidos se presentan en la **Tabla 4.17**. Como puede observarse, los valores experimentales resultaron similares a los predichos.

Tabla 4.17. Comparación de los valores experimentales y predichos obtenidos mediante las condiciones de extracción optimizadas.

	Experimental	Predicho
Antocianinas (mgPg3/100g)	29,60 ± 0,70	29,51
Compuestos fenólicos totales (mg AG/100g)	265,61 ± 3,15	266,27
Capacidad antioxidante (TEAC) (mg Trolox/100g)	3,98 ± 0,10	4,07

La metodología así obtenida, fue contrastada con las técnicas de extracción utilizadas previamente en el grupo de trabajo para evaluar las ventajas y desventajas que presentaba cada una y definir la metodología a utilizar en el desarrollo de la presente tesis.

Las técnicas de extracción de compuestos bioactivos de frutillas desarrolladas previamente en el grupo de trabajo fueron (Escobar-Tovar, A., 2017):

1. Para determinación de compuestos fenólicos totales y capacidad antioxidante: macerado con solución extractora de acetona - agua al 80% (v/v) durante 15 minutos filtrado al vacío, evaporación al vacío del solvente y recomposición en agua.
2. Para la determinación de antocianinas: macerado con solución extractora de etanol - ácido clorhídrico 0,1 N (85:15 v/v) durante 24 horas y posterior filtrado al vacío.

Los valores del rendimiento de los extractos obtenidos mediante estas tres metodologías se presentan en la **Tabla 4.18** y el resultado del ANOVA en la **Tabla 4.19**.

Tabla 4.18. Comparación de los distintos métodos de extracción de compuestos bioactivos y sus rendimientos en la determinación de la capacidad antioxidante.

Método	Antocianinas (mgPg3/100 g)	Fenoles (mg EAG/100 g)	TEAC (mM Trolox/100 g)	ORAC (mM Trolox/100 g)
Acetona - evap	27,58 ± 0,44 a	248,66 ± 8,73 a	2,01 ± 0,01 a	2,65 ± 0,40 NS
Etanol-24 h	24,14 ± 0,42 b	161,41 ± 4,08 b	2,85 ± 0,14 b	3,77 ± 0,93 NS
Etanol-Ultrasonido	29,84 ± 0,45 c	205,33 ± 2,88 c	3,20 ± 0,11 c	3,24 ± 1,31 NS

Los valores fueron expresados como promedio ± desviación estándar. NS: El efecto del factor no es significativo ($p > 0,05$). Medias seguidas de distinta letra minúscula difieren significativamente ($p < 0,05$).

Tabla 4.19. Resultados del ANOVA para comparar los distintos métodos de extracción.

Fuente	CM	GL	F	p-valor
Antocianinas				
Método	24,660	2	127,25	0,0001
Error	0,19	6		
R^2_{aj}	0,97			
Fenoles totales				
Método	4777,13	2	189,50	<0,0001
Error	25,21	6		
R^2_{aj}	0,98			
TEAC				
Método	0,87	2	69,55	0,0002
Error	0,06	6		
R^2_{aj}	0,95			
ORAC				
Método	0,64	2	0,68	0,5496
Error	0,92	3		
R^2_{aj}	0,31			

La extracción asistida por ultrasonido mostró un rendimiento significativamente mayor en el contenido de antocianinas y en los valores TEAC respecto a los demás métodos de extracción evaluados mientras que, la extracción con acetona presentó el mayor contenido de compuestos fenólicos totales. En cuanto a la capacidad antioxidante determinada por el método ORAC, no hubo una influencia significativa del método de extracción utilizado.

La principal ventaja de la utilización de la extracción asistida por ultrasonido radica en la disminución del tiempo de extracción respecto a la técnica convencional utilizando etanol como solvente extractor, como así también respecto a la extracción con acetona que requiere de la posterior evaporación bajo vacío del solvente. Si bien la extracción con acetona mostró ser más efectiva para la extracción de compuestos fenólicos, la utilización del mismo ocasionaría una subestimación en las determinaciones de antocianinas totales y capacidad antioxidante, e involucraría la utilización de un solvente más nocivo que el etanol para el trabajo en el laboratorio.

En resumen, el método de extracción asistida por ultrasonido permitiría el uso de solventes menos peligrosos para el operario y el ambiente, reduciría los tiempos de extracción y por sobre todo, permitiría la utilización de un único extracto para las determinaciones del contenido de antocianinas y compuestos fenólicos, como de la capacidad antioxidante.

4.1.1.8.2 Puesta a punto de las técnicas TEAC y ORAC para la determinación de la capacidad antioxidante

Como se mencionó en la **Sección 3.12.4.1**, se realizó un estudio de la cinética de reacción del radical ABTS \cdot a fines de establecer los tiempos de incubación de las muestras en la técnica TEAC utilizada para la evaluación de la capacidad antioxidante. En las **Figuras 4.17** y **4.18** se presentan las curvas correspondientes a la reacción de ABTS \cdot con soluciones de Trolox y con extracto de frutilla, respectivamente.

En el caso de los estándares de Trolox, se observó que el porcentaje de inhibición del radical ABTS \cdot se mantuvo prácticamente invariable a partir de los 30 min de incubación. Por lo tanto, para la obtención de las curvas de calibración las diferentes soluciones de Trolox fueron incubados durante 30 min.

En el caso de la reacción del radical con los extractos, la estabilización del porcentaje de inhibición del radical se produjo a partir de los 120 min de reacción, en concordancia con datos de bibliografía (Odriozola-Serrano y col., 2010). Por lo tanto, para

las determinaciones de capacidad antioxidante mediante la técnica TEAC de los diferentes extractos de frutillas se utilizó un tiempo de incubación de 120 min.

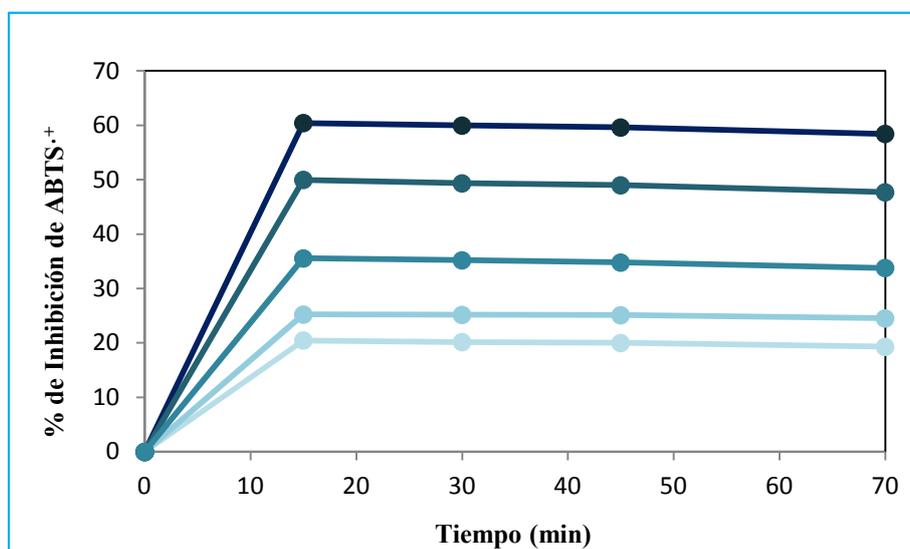


Figura 4.17. Reacción del radical $ABTS\cdot^+$ con soluciones de Trolox de diferentes concentraciones. Las curvas representadas corresponden a concentraciones de Trolox de: (●) 6 μM , (●) 7 μM , (●) 10 μM , (●) 14 μM , (●) 17 μM .

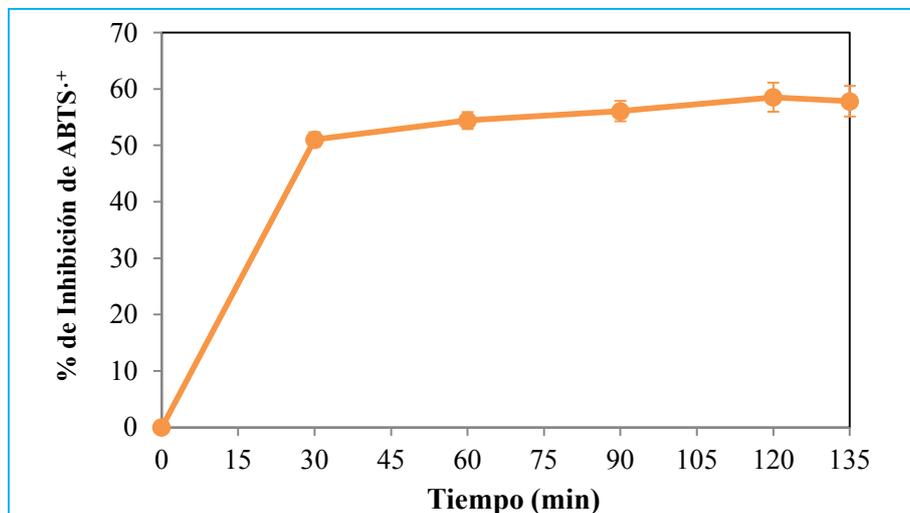


Figura 4.18. Reacción del radical $ABTS\cdot^+$ con extracto de frutilla.

En cuanto a la técnica ORAC, se ensayaron diferentes diluciones de los extractos a fines de obtener una cinética completa de la extinción de fluoresceína en aproximadamente 1 h de medición. Las diluciones que cumplieron esta condición fueron 1:240 y 1:160. En la **Figura 4.19** se muestran las cinéticas obtenidas para dichas diluciones.

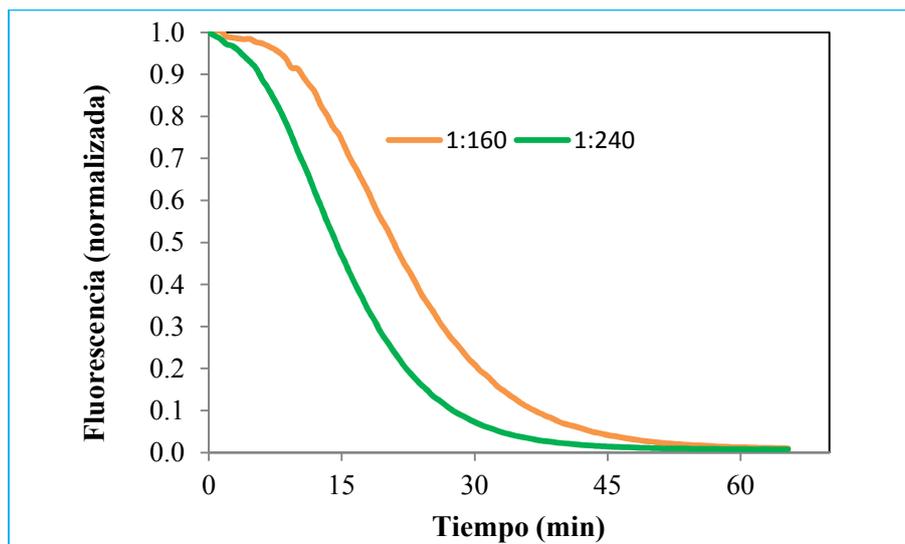


Figura 4.19. Curvas de extinción de Fluoresceína correspondientes a la técnica ORAC. Los extractos fueron diluidos en dos proporciones, 1:160 y 1:240.

En las **Figuras 4.20** y **4.21** se muestran, a modo de ejemplo, una de las curvas de calibración de Trolox obtenidas en las determinaciones de TEAC y ORAC, respectivamente. Para la confección de todas las curvas de calibración utilizadas en la presente tesis, las mediciones correspondientes se realizaron por duplicado (ORAC) o triplicado (compuestos fenólicos totales y TEAC). La base de datos obtenida se analizó estadísticamente mediante un análisis de regresión, obteniendo como resultados del mismo los parámetros del ajuste lineal (pendiente y ordenada al origen), la significancia estadística de los mismos, el R^2 ajustado y la prueba para el ajuste del modelo.

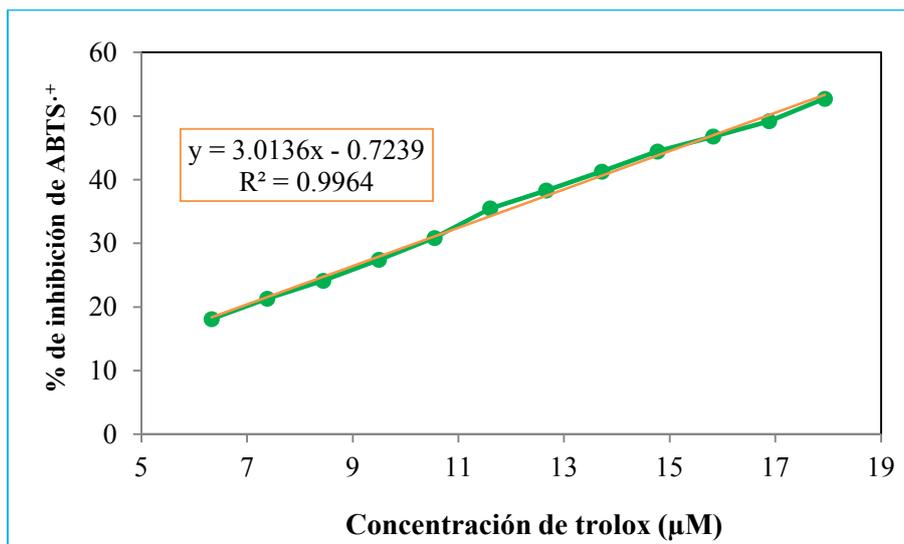


Figura 4.20. Curva de calibración de Trolox correspondiente a la técnica TEAC.

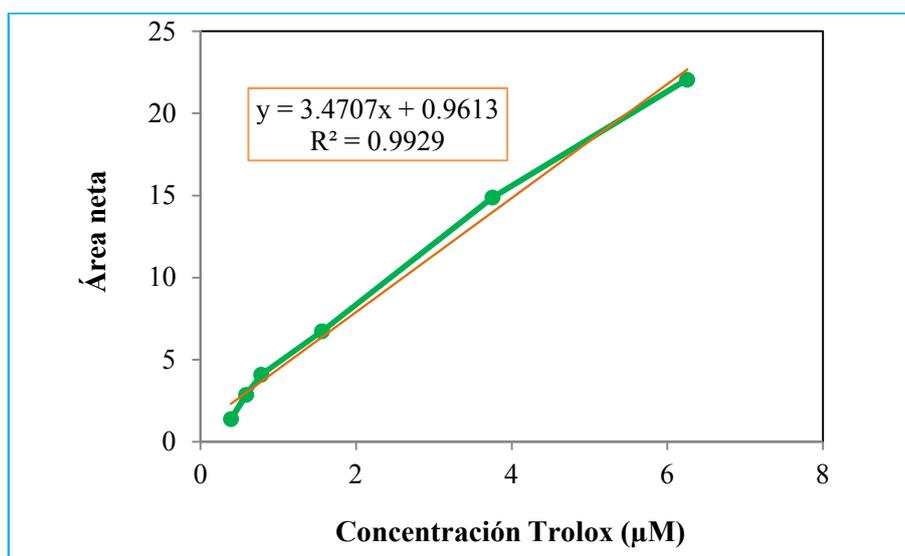


Figura 4.21. Curva de calibración de Trolox correspondiente a la técnica ORAC.

4.1.1.8.3 Efecto del tratamiento con ozono sobre el contenido de compuestos bioactivos y la capacidad antioxidante de tratamientos seleccionados

Las determinaciones del contenido de compuestos bioactivos y capacidad antioxidante se realizaron en ciertas dosis y tiempos de almacenamiento, elegidos en función de los resultados hasta aquí descritos. Desde el punto de vista de la preservación, el tratamiento con ozono durante 5 min mostró ser el más efectivo en la inhibición del desarrollo fúngico durante el almacenamiento, manteniendo las propiedades mecánicas

y disminuyendo la pérdida de peso respecto a los frutos control. Las observaciones microscópicas mostraron micro y ultraestructuras más conservadas en estas muestras, y la evaluación del color mostró una leve alteración en las propiedades ópticas que no resultaron significativas. Por lo expuesto, se decidió evaluar las propiedades antioxidantes en los frutos ozonizados 5 min, y con el fin de establecer el efecto de la dosis de ozono, se analizaron también los frutos tratados con la mayor dosis (15 min). En cuanto al tiempo de almacenamiento, los resultados aquí expuestos indican un límite aceptable en la vida útil de 8 días, ya que para un período mayor de almacenamiento los efectos antifúngicos de todos los tratamientos tienden a igualarse entre sí y respecto al control. Por lo tanto, las determinaciones del contenido de antocianinas, compuestos fenólicos y capacidad antioxidante se realizaron en frutillas control y ozonizadas durante 5 y 15 min a los 0, 4 y 8 días de almacenamiento a 5 ± 1 °C.

En la **Tabla 4.20** se presentan los contenidos de antocianinas (AT) y compuestos fenólicos totales (FT) de frutillas control y ozonizadas durante el almacenamiento. Los resultados del ANOVA se presentan en la **Tabla 4.21**. En ambas variables la interacción entre los factores “tratamiento” y “tiempo de almacenamiento” resultó significativa ($F_{4,81} = 6,13$, $p = 0,0002$ y $F_{4,81} = 3,44$, $p = 0,012$, respectivamente).

El contenido de antocianinas y compuestos fenólicos totales correspondientes a la fruta fresca fueron similares a los reportados en la literatura para frutillas cv. Albion (Ornelas-Paz y col. 2013) y para otras variedades (Cordenunsi y col., 2003). Los frutos no tratados presentaron un aumento del contenido de antocianinas durante el almacenamiento, siendo este incremento significativo al octavo día de almacenamiento. En cuanto a los frutos ozonizados, las muestras tratadas durante 5 min no presentaron diferencias significativas en el contenido de AT durante el almacenamiento respecto al control, mientras que los frutos ozonizados durante 15 min presentaron valores significativamente menores al control al final del almacenamiento. Al igual que lo observado para el contenido de AT, la concentración de compuestos fenólicos de los frutos control aumentó significativamente al día 8 del almacenamiento. El contenido de FT de los frutos ozonizados durante 5 min también aumentó significativamente al día 8, sin presentar variaciones significativas en relación a los valores del control almacenado. Por el contrario, siguiendo el mismo patrón que el observado para el contenido de AT, la acumulación de compuestos fenólicos de los frutos tratados durante 15 min fue significativamente menor al control, al día 8 de almacenamiento.

Tabla 4.20. Contenido de antocianinas y compuestos fenólicos de frutillas control y ozonizadas durante el almacenamiento a 5 ± 1 °C.

Tratamiento	Día	Antocianinas (mgPg3/100g)	Fenoles totales (mgGA/100g)
Control	0	224,7 ± 68,5 a	1655,5 ± 234,2 a
	4	309,1 ± 49,9 a, b	1725,3 ± 174,0 a
	8	350,7 ± 88,7 b	2417,8 ± 297,9 c, d
5 min	0	285,6 ± 43,9 a, b	1902,0 ± 187,0 a, b
	4	240,2 ± 72,9 a	1649,3 ± 205,6 a
	8	271,4 ± 66,2 a, b	2589,6 ± 374,2 d
15 min	0	274,2 ± 75,6 a, b	1917,2 ± 399,6 a, b
	4	302,9 ± 75,0 a, b	1689,5 ± 211,6 a
	8	230,6 ± 46,8 a	2201,9 ± 185,7 b, c

Los valores representan el promedio ± desviación estándar.

Promedios seguidos de distinta letra minúscula difieren significativamente ($p < 0,05$).

Diversas variables pueden influir en el patrón de acumulación de antocianinas durante el almacenamiento, particularmente el cultivar de frutillas con la que se trabaja y las condiciones de almacenamiento, siendo mayor el contenido de AT a temperaturas más elevadas (Cordenunsi y col. 2005). Dichas variables también han sido asociadas a diferentes tendencias en la acumulación de compuestos fenólicos (Shin y col. 2007; Cordenunsi y col. 2005). En concordancia con los resultados aquí expuestos, Ayala-Zavala y col. (2004) observaron un aumento de la biosíntesis de antocianinas y compuestos fenólicos en frutillas cv. Chandler al almacenarlas a 5 °C. Sin embargo, otros autores (Cordenunsi y col., 2005; Octavia y col., 2017) reportaron en otras variedades de frutillas una disminución en la concentración de estos compuestos o cambios no significativos durante el almacenamiento a temperaturas similares a la utilizada en esta tesis.

Tabla 4.21. Resultados del ANOVA para el contenido de antocianinas y compuestos fenólicos totales de frutillas control y ozonizadas almacenadas a 5 ± 1 °C.

Fuente	CM	GL	F	p-valor
<i>Antocianinas</i>				
Día	5132,18	2	1,15	0,3220
Tratamiento	7578	2	1,7	0,1897
Tratamiento*Día	27373,43	4	6,13	0,0002
Error	4466,18	81		
R^2_{aj}	0,2			
<i>Compuestos fenólicos</i>				
Día	4321929,98	2	61,73	<0,0001
Tratamiento	126446,02	2	1,81	0,1709
Tratamiento*Día	240594,09	4	3,44	0,012
Error	70013,62	81		
R^2_{aj}	0,6			

Existen escasos reportes en la literatura en donde se evalúe el efecto de los tratamientos de ozono en fase acuosa sobre la acumulación de compuestos bioactivos en frutillas. En particular, y contrastando los resultados de esta tesis, Alexandre y col. (2012) observaron una mejor retención del contenido de AT y FT en frutillas cv. Camarosa ozonizadas ($0,3 \text{ mg.L}^{-1}$ durante 2 min) respecto al control durante el almacenamiento refrigerado. Estas discrepancias podrían asociarse, en parte, a dos variables importantes: la diferente dosis de ozono aplicada y la utilización de cultivares de frutillas diferentes.

Los resultados de la capacidad antioxidante, determinada mediante las técnicas TEAC y ORAC, se presentan en la **Tabla 4.22**. El análisis estadístico indicó que la interacción entre los factores “tratamiento” y “tiempo de almacenamiento” no resultó significativa ($F_{4, 81} = 1,76$, $p = 0,5424$ y $F_{4, 45} = 1,25$, $p = 0,3034$, respectivamente), como puede verse en la **Tabla 4.23**. En ambos casos, sólo el efecto principal del tiempo de almacenamiento resultó significativo (**Tabla 4.23**).

Tabla 4.22. Capacidad antioxidante de frutillas control y ozonizadas durante el almacenamiento refrigerado a 5 ± 1 °C, determinada mediante las técnicas TEAC y ORAC.

TEAC (mM Trolox/100 g b.s)				
Tratamiento	Tiempo de almacenamiento (día)			Promedio
	0	4	8	
Control	32,8 ± 3,1	31,8 ± 5,7	33,8 ± 5,1	32,8 ± 4,7 ns
5 min O₃	36,1 ± 4,0	31,2 ± 5,6	36,6 ± 6,8	34,6 ± 6,0 ns
15 min O₃	36,9 ± 4,9	32,1 ± 5,1	31,5 ± 4,0	33,5 ± 5,2 ns
Promedio	35,3 ± 4,3 B	31,7 ± 5,3 A	34,0 ± 5,6 A, B	

ORAC (mM Trolox/100 g b.s)				
Tratamiento	Tiempo de almacenamiento (día)			Promedio
	0	4	8	
Control	27,2 ± 5,9	42,5 ± 5,9	48,0 ± 4,2	39,2 ± 10,4 ns
5 min O₃	31,5 ± 7,5	36,1 ± 6,7	45,3 ± 4,5	37,6 ± 8,4 ns
15 min O₃	31,8 ± 1,9	43,5 ± 5,7	47,2 ± 10,9	40,9 ± 9,6 ns
Promedio	30,2 ± 5,7 A	40,7 ± 6,7 B	46,8 ± 6,9 C	

Los valores representan el promedio ± desvío estándar. NS: El efecto del factor no es significativo ($p > 0,05$). Los días de almacenamiento seguidos de distinta letra mayúscula difieren significativamente ($p < 0,05$).

En los resultados obtenidos por la técnica TEAC se observó una disminución significativa al día 4, principalmente en los frutos ozonizados. En general, los valores TEAC tendieron luego a incrementarse hacia el final del almacenamiento, alcanzando valores que no difirieron significativamente a los correspondientes al día 0. Por el contrario, los resultados obtenidos mediante la técnica ORAC presentaron una tendencia diferente durante el almacenamiento. Tanto las muestras control como tratadas presentaron un incremento significativo de los valores ORAC a lo largo de todo el período de almacenamiento estudiado.

Tabla 4.23. Resultados del ANOVA para las determinaciones de capacidad antioxidante de frutillas control y ozonizadas almacenadas a 5 ± 1 °C.

Fuente	CM	GL	F	p-valor
TEAC				
Día	0,8324	2	2,8925	0,0612
Tratamiento	0,4944	2	1,7182	0,1859
Tratamiento*Día	0,2240	4	0,7785	0,5424
Error	0,2878	81		
R ² _{aj}	0,13			
ORAC				
Día	1281,13	2	61,54	<0,0001
Tratamiento	47,0100	2	1,16	0,3236
Tratamiento*Día	50,80	4	1,25	0,3034
Error	40,62	45		
R ² _{aj}	0,61			

En la **Tabla 4.24** se presentan la matriz resultante del análisis de correlación de Pearson del contenido de AT, FT y capacidad antioxidante. Los valores por encima de la diagonal indican la significancia entre la correlación de los factores, mientras que debajo de la diagonal se presentan los coeficientes de correlación. Si bien cualitativa-mente pudo observarse una misma tendencia entre la acumulación de antocianinas y compuestos fenólicos de frutos tratados y control durante el almacenamiento, el análisis estadístico no indicó que dicha correlación fuese significativa ($p = 0,67$). Por otro lado, se observó una correlación significativas entre FT y los valores TEAC ($r = 0,59$, $p < 0,0001$), FT y los valores ORAC ($r = 0,45$, $p < 0,001$), y AT y los valores ORAC ($r = 0,39$, $p < 0,004$). Si bien los compuestos fenólicos, incluyendo a las antocianinas, son compuestos abundantes en las frutillas y con conocida actividad antioxidante, la correlación observada entre los mismos con la capacidad antioxidante fue débil, ya que presentaron coeficientes de correlación por debajo de 0,6. Resultados similares fueron reportados por Meyers y col. (2003), Cordenunsi y col. (2005) y Rekika y col. (2005); mientras que Kalt y col. (1999) encontraron una correlación fuerte y positiva entre el contenido de AT y FT con los valores ORAC de frutillas almacenadas en refrigeración. Estas diferencias podrían estar asociadas con las interacciones antagónicas, como así

también aditivas ó sinérgicas, que pueden darse entre distintos compuestos fenólicos de la fruta, como también con otros fitoquímicos. Por lo tanto, la actividad antioxidante podría verse afectada por las proporciones relativas de estos compuestos o bien por la presencia de un compuesto fenólico en particular (Meyers y col., 2003; Salucci y col., 1999). Además, otros componentes como la vitamina C contribuyen a la capacidad antioxidante. En particular, se ha reportado que esta vitamina representa entre el 9 y 15 % del valor ORAC (Kalt y col., 1999).

Numerosos autores han encontrado un incremento en las propiedades antioxidantes de diversas frutas como consecuencia de tratamientos con ozono en fase acuosa o gaseosa (Minas y col., 2010; Onopiuk y col., 2017; Silveira y col., 2018). Este aumento en la capacidad antioxidante estaría relacionado, como se mencionó anteriormente, con respuestas de defensa desencadenadas por la exposición de la planta a condiciones de estrés abiótico, como el tratamiento con ozono. Sin embargo, en las dosis ensayadas en esta tesis no se detectó un aumento en el potencial antioxidante de las frutillas.

Tabla 4.24. Resultados del análisis de correlación de Pearson para el contenido de antocianinas, compuestos fenólicos y capacidad antioxidante de frutos tratados y control durante el almacenamiento a 5 ± 1 °C.

	AT	FT	TEAC	ORAC
AT	1,00	0,6739	0,6988	0,0040
FT	0,04	1,00	<0,0001	0,0006
TEAC	0,04	0,59	1,00	0,1902
ORAC	0,38	0,45	0,18	1,00

4.1.1.9 Efecto del tratamiento con ozono sobre los atributos sensoriales

El análisis sensorial llevado a cabo con consumidores para evaluar si existían cambios sensoriales en los frutos por efecto del tratamiento, fue realizado analizando sólo las muestras ozonizadas durante 5 min. No se evaluaron dosis de ozono mayores ya que, de acuerdo a los resultados expuestos anteriormente, mayores tiempos de tratamiento no aumentaron significativamente la inhibición del desarrollo fúngico ni mejoraron los parámetros de calidad evaluados. Los resultados del análisis sensorial se presentan en la **Tabla 4.25**. Los puntajes promedio resultantes de la evaluación global de los consumidores de las muestras tratadas fueron normalizados con el puntaje promedio

correspondiente al control. Incorporando el efecto placebo, el puntaje de las muestras tratadas se ubicó en la categoría de “levemente diferente”, en ambos períodos de almacenamiento estudiados (días 1 y 3). El análisis estadístico determinó que los juicios emitidos por los sujetos no fueron significativamente diferentes, lo que indicaría que hubo coherencia entre las respuestas y que los consumidores se comportaron como un grupo. Además, los puntajes obtenidos en las muestras ozonizadas y el control camuflado no resultaron significativamente diferentes, lo que indicó que los consumidores no fueron capaces de discernir o identificar diferencias en las características sensoriales de las frutillas como consecuencia del tratamiento con ozono.

Tabla 4.25. Análisis de la varianza para los puntajes asignados por los panelistas a las diferencias encontradas entre los frutos ozonizados y control almacenados 1 y 3 días a 5 ± 1 °C.

DÍA 1					
Factor	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrados medios	F	p-valor
Muestra	0,01	1	0,01	0,01	0,9138
Sujeto	60,92	55	1,11	1,47	0,0788
Error	41,49	55	0,75		
Total	102,42	111			

DÍA 3					
Factor	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrados medios	F	p-valor
Sujeto	62,78	55	1,14	1,55	0,0528
Muestra	0,08	1	0,08	0,11	0,7421
Error	40,42	55	0,73		
Total	103,28	111			

Hasta nuestro conocimiento, no existen reportes en la literatura en donde se haya evaluado el efecto de la ozonización en fase acuosa sobre las características sensoriales de frutillas.

En tratamientos con ozono en fase gaseosa, Pérez y col. (1999) y Nadas y col. (2003) reportaron un efecto negativo sobre el aroma de frutillas luego de haber sido expuestas a atmósferas enriquecidas con ozono.

4.1.1.10 Integración de resultados de la Sección 4.1.1

La preservación de la estructura es uno de los principales objetivos del procesamiento de las frutas en la postcosecha, ya que alteraciones en la estructura pueden conducir a cambios indeseables en la textura, el sabor, la apariencia, las propiedades mecánicas y nutricionales, la pérdida de peso y también favorecer el ataque de patógenos (Aguilera y col., 1999).

La respuesta mecánica de los frutos ozonizados y control podría ser parcialmente explicada por los cambios observados a nivel micro y ultraestructural. En general, en tejidos parenquimáticos, la presión de turgor dentro de las células, la rigidez de la pared celular, la adhesión célula-célula (determinada por la integridad de la laminilla media y los plasmodesmos) son ampliamente reconocidos como los factores estructurales más importantes que determinan las características reológicas de los alimentos derivados de plantas (Jackman y col., 1995; Waldron y col., 1997; Alzamora y col., 2008). En frutas pequeñas, como las *berries*, la estructura y la composición de la pared tangencial externa sería indudablemente importante en la respuesta a la punción.

La frutilla se caracteriza por presentar una cutícula débil; por lo tanto, el rol de los tejidos subepidérmicos, vasculares y corticales no puede ser despreciado, siendo todos ellos componentes importantes biológicamente por razones mecánicas (Duarte-Molina y col., 2016). El ablandamiento de las frutillas durante la maduración y senescencia ha sido asociado a diversos procesos de degradación de la pared celular, tales como la solubilización y depolimerización de pectina, pérdida de arabinosa y galactosa, y reducciones en el contenido de hemicelulosa, como también a alteraciones en la membrana (Posé y col., 2012). Las diferencias en las imágenes de la pared celular observadas en los frutos almacenados podrían ser relacionadas con los procesos químicos mencionados anteriormente. La pérdida de turgencia de las células debido a la plasmólisis del protoplasma y/o a la ruptura de membranas y las alteraciones en las paredes en el almacenamiento, resultaría en una disminución en los valores de E_d (pérdida de rigidez). Tanto en las frutillas tratadas como no tratadas, la desorganización de la pared celular, la disminución en la adhesión de las paredes, y la pérdida de turgencia, provocaron el plegamiento y el colapso de las paredes celulares y, por consiguiente, un decremento de la resistencia a la deformación (mayores valores de D). Las imágenes de los frutos almacenados presentaron varias similitudes entre las frutillas ozonizadas y control; por lo tanto, el efecto del almacenamiento en los tejidos fue notable.

Las leves modificaciones en la estructura observada en los tejidos inmediatamente después de la aplicación de los tratamientos no se reflejó en diferencias significativas en los parámetros mecánicos en relación a los frutos control. Esto podría ser atribuido a la presencia de efectos estructurales opuestos (leve contracción del tejido subepidérmico y cortical adyacente y reforzamiento de paredes celulares versus plasmólisis en algunas células).

La cutícula juega un rol decisivo en la calidad postcosecha. Como antes se expresara, la composición y el espesor de la cutícula y las ceras epicuticulares se encuentra asociada con la susceptibilidad a infecciones, la permeabilidad y pérdida de agua, y la textura de la fruta durante el almacenamiento (Lara y col., 2014). Las diferencias observadas en la pérdida de agua entre las distintas muestras deberían ser esperadas teniendo en cuenta las alteraciones superficiales encontradas en los tejidos de las frutillas ozonizadas y control. Al día 8 del almacenamiento, las imágenes de MET y MO revelaron diferencias en la cutícula de los frutos expuestos a ozono 5 min, que apareció notablemente más reforzada y más gruesa que en el control y los frutos ozonizados durante 15 min. Al día 12, a pesar de la aparición de microgrietas ocasionales, la cutícula se observó muy reticulada y con alta tinción. Estas imágenes de la cutícula respaldan un gran efecto protector contra la pérdida de humedad. En concordancia, la cutícula de las frutillas ozonizadas 15 min almacenadas 8 días se observaron más finas y menos electrodensas que el control almacenado, lo que podría asociarse con la mayor pérdida de peso observada en estas muestras.

Del mismo modo, el reforzamiento de la cutícula de los frutos tratados durante 5 min respaldaría la mayor reducción observada en el desarrollo fúngico (micoflora nativa y *B. cinerea* inoculada artificialmente) en comparación al control y los frutos ozonizados a mayores tiempos. Sandermann y col. (1998) discutieron el efecto que podría tener el ozono sobre el estatus de defensa de las plantas. Como se mencionó anteriormente, cuando los órganos de las plantas son expuestos a condiciones de estrés abióticas, tales como el ozono, se activa la acumulación de especies reactivas de oxígeno (ROS). Se ha reportado que las especies de oxígeno activadas por los tratamientos con ozono inducen la acumulación de fitoalexinas (isoflavonoides y estilbenos), la enzima que participa en la biosíntesis de lignina, proteínas relacionadas con la patogénesis, y sistemas antioxidantes (Sandermann y col., 1998). Sin embargo, el tipo de respuesta biológica que altera los niveles de ROS es dosis dependiente. Un incremento transitorio y moderado en los niveles de ROS podría inducir mecanismos de protección y respuestas de aclimatación

contra el factor de estrés abiótico y oxidativo, mientras que dosis altas podrían inducir la muerte celular (Gechev y col., 2006). Por consiguiente, al incrementar el estrés provocado por el ozono (al aumentar el tiempo de exposición), la capacidad antioxidante no podría superar la producción de ROS y el tratamiento tendría un efecto perjudicial, incrementando la senescencia y consecuentemente, la respiración y la pérdida de agua.

A pesar de que como parte de la respuesta de defensa se podría inducir un incremento en las propiedades antioxidantes, este efecto no fue encontrado ni para el tiempo de exposición a ozono de 5 min ni para tiempos mayores. Esto abre nuevos interrogantes que podrían ser dilucidados con estudios a futuro sobre los cambios cualitativos en el perfil de compuestos fenólicos como así también estudios *in vivo* de actividad antioxidante.

Por último, la evaluación de las propiedades ópticas y de atributos sensoriales de los frutos tratados, indicaron que la exposición al ozono durante 5 min no ocasionaría un detrimento significativo en el color de los frutos, sino que además, las leves diferencias detectadas instrumentalmente no serían percibidas por el público consumidor. Dado que la efectividad de estos tratamientos se encontraría íntimamente asociada a la respuesta de la matriz en cuestión, y que la misma puede diferir entre distintos cultivares de una misma especie, sería conveniente evaluar estos tratamientos en otros cultivares de frutillas de manera de poder optimizar el diseño de un tratamiento postcosecha específico para cada una de ellas.

4.1.2 Tratamiento individual de luz pulsada

4.1.2.1 Efecto de la luz pulsada sobre la respuesta microbiana

4.1.2.1.1 Evolución de la micoflora nativa de frutillas

En la **Figura 4.22** se presenta la evolución del porcentaje de frutos infectados por la microbiota nativa de frutillas tratadas y control durante el almacenamiento a 5 ± 1 °C. En todas las muestras se observó un aumento del número de frutos infectados durante el almacenamiento. No se produjo un retardo en la aparición de infección por efecto de los tratamientos con luz pulsada, ya que en todas las muestras se visualizó desarrollo fúngico al segundo día de almacenamiento. Sin embargo, en el caso de los frutos irradiados durante 10 s (fluencia = $11,9 \text{ J.cm}^{-2}$), el porcentaje de infección resultó levemente superior al control. Por el contrario, en las muestras tratadas durante 20 s (fluencia = $23,9 \text{ J.cm}^{-2}$), el nivel de infección fue menor. En estas muestras se alcanzó un porcentaje de infección 17 % menor al del control al día 8, y del 14 % al final del almacenamiento (día 12).

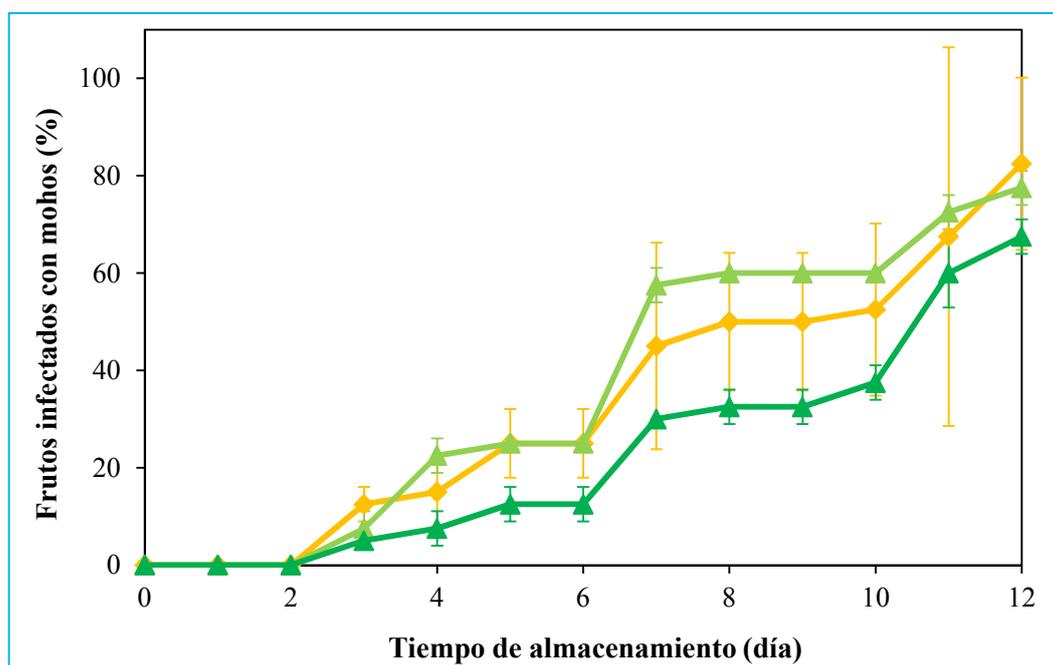


Figura 4.22. Porcentaje de frutos infectados con micobiota nativa en muestras control y tratadas con luz pulsada durante el almacenamiento a 5 ± 1 °C. (■) Control, (▲) LP $11,9 \text{ J.cm}^{-2}$, (▲) LP $23,9 \text{ J.cm}^{-2}$. Los valores representan el promedio y las barras verticales la desviación estándar.

Los promedios del porcentaje acumulado de frutos infectados durante el almacenamiento y los resultados del ANOVA se presentan en las **Tablas 4.26** y **4.27**, respectivamente. El análisis estadístico indicó que la interacción entre los factores “tratamiento” y “tiempo de almacenamiento” no fue significativa ($F_{6, 12} = 0,5$, $p = 0,7969$) pero sí fueron significativos los efectos principales de ambos factores (**Tabla 4.26**). La inhibición de la microbiota nativa de las frutillas mostró tener una dependencia directa con la dosis de luz pulsada. Sólo la dosis de 20 s condujo a una reducción estadísticamente significativa del porcentaje de frutos infectados respecto al control.

Diversos factores influyen en la efectividad antimicrobiana de los tratamientos con luz pulsada; entre ellos podemos mencionar la dosis aplicada (distancia a la lámpara, espectro de emisión, número de pulsos, tiempo de tratamiento, etc), la accesibilidad de la luz pulsada al microorganismo (efecto “sombra” debido a las irregularidades de la superficie expuesta), la sensibilidad del microorganismo objetivo, la etapa de desarrollo en el cual se encuentra dicho microorganismo, la posibilidad del desarrollo de resistencia por parte del microorganismo o bien de la matriz (respuesta fisiológica de la planta) (Kramer y col., 2016; Lagunas-Solar y col., 2006). Todos estos factores dificultan el diseño de un tratamiento e incluso la comparación de los resultados obtenidos en diferentes estudios.

En este sentido, es posible superar alguna de estas barreras al comparar los resultados de esta tesis con estudios previos del grupo (Duarte-Molina y col., 2016), en los cuales las variables asociadas al equipamiento de luz pulsada y metodología experimental fueron similares, pero se trabajó con otro cultivar de frutillas (Camarosa) provenientes de la misma región de cultivo. En estos estudios se evaluó el efecto de distintas dosis (2 - 40 s de LP; fluencias: 2,4 – 47,8 J.cm⁻²) sobre la micoflora nativa durante el almacenamiento a 6 °C. Obtuvieron una reducción significativa del nivel de infección respecto al control (~30 - 42 %, al día 8) para los tratamientos de 10, 20 y 40 s, sin encontrar diferencias significativas entre las dosis mencionadas.

Tabla 4.26. Evolución del porcentaje de frutos infectados por micoflora nativa de frutillas control y tratadas con luz pulsada durante el almacenamiento a 5 ± 1 °C.

Tratamiento	Tiempo de almacenamiento (día)				
	4	6	8	10	
Control	15,0 ± 7,1	25,0 ± 7,1	50,0 ± 14,1	52,5 ± 17,7	a
LP 11,9 J.cm ⁻²	22,5 ± 3,5	25,0 ± 0,0	60,0 ± 0,0	60,0 ± 0,0	a
LP 23,9 J.cm ⁻²	7,5 ± 3,5	12,5 ± 3,5	32,5 ± 3,5	37,5 ± 3,5	b
	A	A	B	B	

Los valores representan el promedio ± desviación estándar. Los tratamientos seguidos de distinta letra minúscula difieren significativamente ($p < 0,05$). Los días de almacenamiento seguidos de distinta letra mayúscula difieren significativamente ($p < 0,05$).

Tabla 4.27. Resultados del ANOVA para la evolución de la microbiota nativa de frutillas control y tratadas con luz pulsada durante el almacenamiento a 5 ± 1 °C.

Fuente	CM	GL	F	p-valor
Día	1941,67	3	34,52	<0,0001
Tratamiento	782,29	2	13,91	0,0007
Tratamiento*Día	28,12	6	0,50	0,7969
Error	56,25	12		
R ² _{aj}	0,84			

Estos resultados coinciden parcialmente con los obtenidos en esta tesis en frutillas cv. Albion. La principal diferencia se presenta en el tratamiento de 10 s, que en esta variedad no logró una reducción significativa de la infección respecto al control. Además, la dosis de 20 s tampoco logró las reducciones reportadas por Duarte-Molina y col. (2016). Queda en evidencia el efecto que tendría la matriz en la efectividad de este tratamiento, como así también la diferente carga inicial del lote, estimada con el porcentaje de infección de las muestras control al día 12 de almacenamiento. En el estudio de Duarte-Molina y col. (2016) el control alcanzó un nivel de infección de aproxi-

madamente 50 % al día 8, mientras que en esta tesis el control presentó un porcentaje de infección mayor (80 %). No sólo el nivel de contaminación inicial es importante sino también los distintos microorganismos presentes, cuya sensibilidad a la luz pulsada podría ser diferente.

4.1.2.1.2 Evolución de *Botrytis cinerea* inoculado en frutillas

En la **Figura 4.23** se presenta la evolución del porcentaje de frutos infectados con *Botrytis cinerea* (inoculado artificialmente) en frutillas, durante el almacenamiento a 5 ± 1 °C. Se observó un aumento en el porcentaje de frutos infectados durante el almacenamiento tanto en frutos control como tratados con LP. Las dos dosis de LP estudiadas lograron retardar dos días la aparición de infección respecto al control. Estas dosis permitieron además, reducir el porcentaje de frutos infectados en relación al control a lo largo del período de almacenamiento estudiado. La incidencia de *B. cinerea* en las frutillas tratadas fue aproximadamente 20 – 30 % menor al control al día 8, pero al día 12 los porcentajes de infección fueron similares.

La evolución del porcentaje de frutos infectados acumulado y el análisis estadístico correspondiente se presenta en las **Tablas 4.28** y **4.29**, respectivamente. El ANOVA indicó que la interacción entre los factores “tratamiento” y “tiempo de almacenamiento” resultó no significativa ($F_{6, 24} = 0,97$, $p = 0,4650$) pero los efectos principales de ambos factores resultaron significativos (**Tabla 4.29**). Todos los períodos de almacenamiento analizados resultaron estadísticamente diferentes. Por otro lado, la reducción del desarrollo de *B. cinerea* en las muestras expuestas a LP en comparación al control, resultó estadísticamente significativa para ambas dosis. Además, si bien se observó un comportamiento inesperado en cuanto a que en la mayor dosis de LP aplicada el porcentaje de frutos infectados aumentó levemente, las diferencias entre las dosis evaluadas no resultaron significativas.

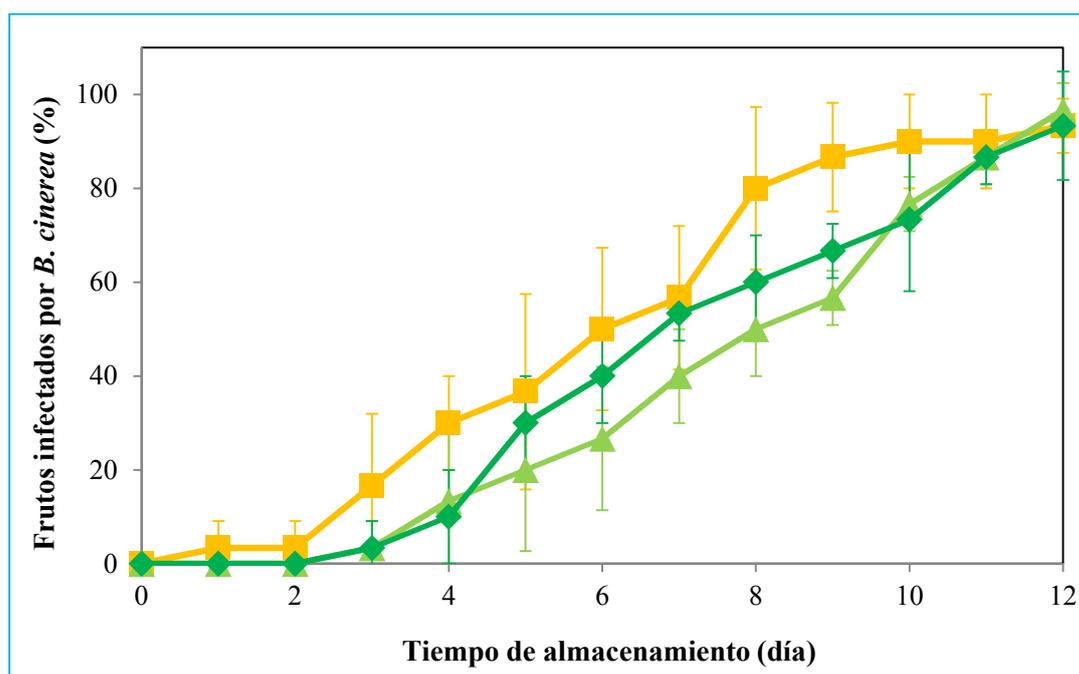


Figura 4.23. Incidencia de *Botrytis cinerea* (%) en frutillas control y tratadas con LP durante el almacenamiento a 5 ± 1 °C. (■) Control inoculado, (▲) LP 11,9 J.cm⁻², (◆) LP 23,9 J.cm⁻². Los valores representan los promedios y las barras verticales la desviación estándar.

Tabla 4.28. Evolución del porcentaje de frutos infectados con *Botrytis cinerea* en frutillas control y tratadas con LP durante el almacenamiento a 5 ± 1 °C.

Tratamiento	Tiempo de almacenamiento (día)					
	2	4	6	8	10	
Control	3,3 ± 5,8	30,0 ± 10,0	50,0 ± 17,3	80,0 ± 17,3	90,0 ± 10,0	a
LP 11,9 J.cm⁻²	0,0 ± 0,0	13,3 ± 15,3	26,7 ± 15,2	50,0 ± 10,0	76,7 ± 5,8	b
LP 23,9 J.cm⁻²	0,0 ± 0,0	10,0 ± 10,0	40,0 ± 10,0	60,0 ± 10,0	73,3 ± 15,3	b
	A	B	C	D	E	

Los valores representan el promedio ± desvío estándar. Los tratamientos seguidos de distinta letra minúscula difieren significativamente (p<0,05). Los días de almacenamiento seguidos de distinta letra mayúscula difieren significativamente (p<0,05).

Tabla 4.29. Resultados del ANOVA para la evolución de la infección por *Botrytis cinerea* (%) en frutillas control y tratadas con LP durante el almacenamiento a 5 ± 1 °C.

Fuente	CM	GL	F	p-valor
Día	6521,30	3	48,91	<0,0001
Tratamiento	1077,78	2	8,08	0,0021
Tratamiento*Día	129,63	6	0,97	0,4650
Error	133,33	24		
R ² _{aj}	0,82			

Al comparar los resultados de *B. cinerea* con los de micoflora nativa, se pudo observar un retardo de dos días en el inicio de infección con *B. cinerea* respecto al control. Además, ambas dosis ensayadas tuvieron un efecto significativo en la reducción del nivel de infección del microorganismo inoculado durante el almacenamiento.

Estos resultados contradicen los reportados por Marquenie y col. (2003) que no encontraron un efecto significativo del tratamiento con luz pulsada (40 – 250 segundos a 25 cm de la lámpara, fluencia no reportada) sobre conidios de *B. cinerea* inoculados en frutillas cv. Elsanta. Por otra parte, Luksiene y col. (2013) reportaron reducciones de 2,2 y 1,0 log de mesófilos y mohos y levaduras, respectivamente, luego de irradiar frutillas con dosis de luz pulsada de $13,9 \text{ J.cm}^{-2}$.

Los resultados de los estudios de aplicación de luz pulsada son diversos y generalmente contradictorios, incluso al estudiar los mismos microorganismos y la misma matriz. Como se comentó anteriormente, numerosos factores influyen en la eficacia de estos tratamientos. El diseño de tratamientos que permitan la irradiación multidireccional y la rotación de las muestras, es otro aspecto que se requiere estudiar para lograr una mayor uniformidad de la dosis aplicada, y de esta manera mejorar la efectividad antimicrobiana de esta técnica.

4.1.2.2 Efecto del tratamiento con luz pulsada sobre los parámetros mecánicos

Los perfiles de punción característicos de frutillas tratadas con LP y control a los 0 y 8 días de almacenamiento se presentan en las **Figuras 4.24** y **4.25**, respectivamente. Las curvas mostraron un incremento lineal en la fuerza hasta llegar al punto de ruptura de la epidermis (F_R). Al igual que lo observado en el lote utilizado para los tratamientos

con ozono, la epidermis contribuyó con aproximadamente el 55-60% de la firmeza del fruto hasta el punto de ruptura, tanto en los frutos control como irradiados. El resto del perfil correspondió al avance de la punta en el receptáculo, presentando iguales características a las descritas en la **Sección 4.1.1.5**. Luego de 8 días de almacenamiento, los perfiles de punción no sufrieron grandes cambios respecto al día 0 en la zona correspondiente al epicarpio pero si hubo modificaciones en las otras partes del receptáculo, atribuibles a la heterogeneidad de los tejidos y a los cambios específicos de éstos durante el almacenamiento.

Los valores promedio de los parámetros mecánicos obtenidos de las curvas del ensayo de punción se presentan en la **Tabla 4.30**. Los datos fueron analizados estadísticamente mediante un MANOVA, cuyos resultados se muestran en la **Tabla 4.31**. En este análisis, al igual que lo comentado en la **Sección 4.1.1.5**, se excluyó el parámetro W del análisis multivariado debido a que presentaba una alta correlación con el parámetro F_R .

El MANOVA indicó que la interacción entre los factores “tratamiento” y “tiempo de almacenamiento” fue significativa ($F_{4, 277} = 3,87, p = 0,0039$).

No se observaron cambios significativos en los parámetros mecánicos de los frutos expuestos a la LP en relación al control. Sin embargo, los frutos irradiados con luz pulsada mostraron un incremento de E_d al cuarto día de almacenamiento y posterior disminución hacia el día 8. Los cambios en la F_R de estas muestras resultaron mínimos. Por otra parte, el almacenamiento refrigerado ocasionó alteraciones en los parámetros mecánicos, tanto de frutos tratados como control. Dichas alteraciones fueron más notorias en los parámetros E_d y D . En el caso de los frutos control, se observó una disminución de D , que contribuyó a un aumento de E_d al cuarto día de almacenamiento. Al día 8, F_R y E_d disminuyeron mientras que D aumentó, lo cual correspondería a tejidos más blandos, menos rígidos y más deformables.

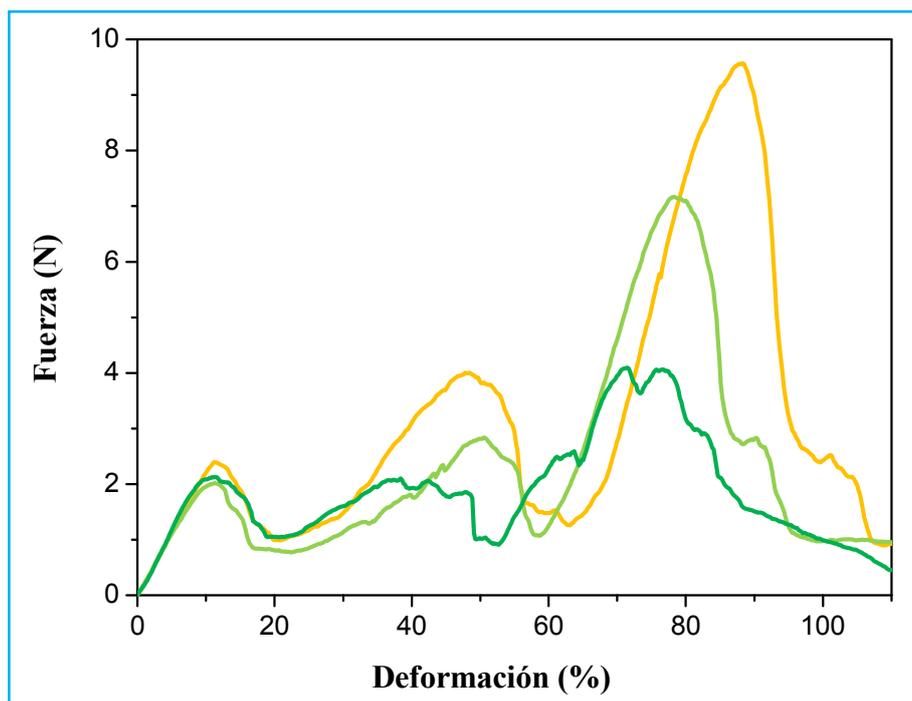


Figura 4.24. Perfiles característicos del ensayo de punción de frutillas tratadas con LP y control al día 0 de almacenamiento. (■) Control, (▲) LP 11,9 J.cm⁻², (▲) LP 23,9 J.cm⁻².

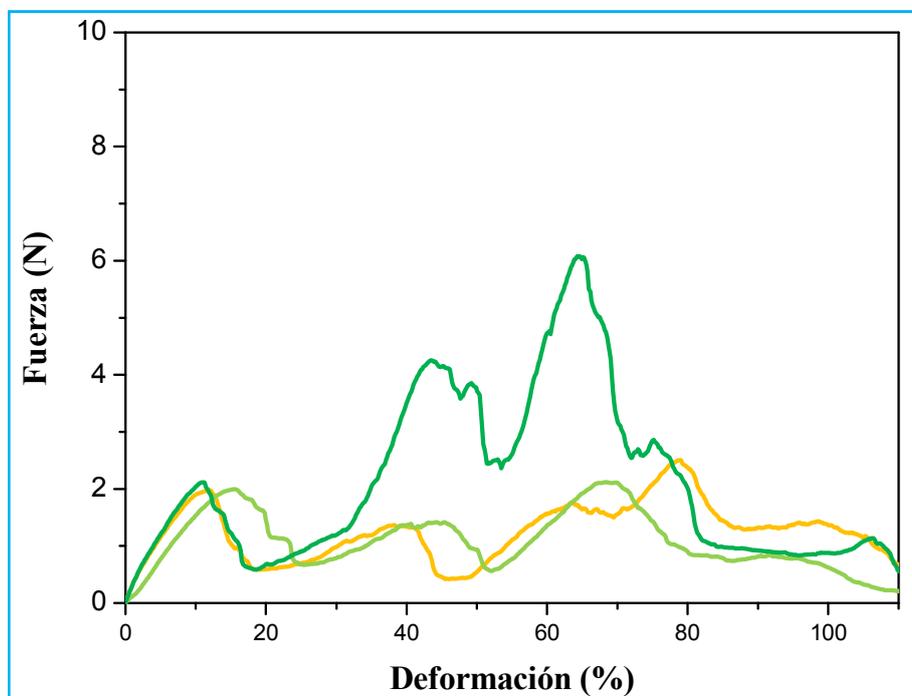


Figura 4.25. Perfiles característicos del ensayo de punción de frutillas tratadas con LP y control al día 8 de almacenamiento. (■) Control, (▲) LP 11,9 J.cm⁻², (▲) LP 23,9 J.cm⁻².

Coincidentemente con los estudios expuestos, Marquenie y col. (2003) tampoco encontraron diferencias significativas en el comportamiento mecánico de frutillas (cv. Elsanta) irradiadas con LP en relación al control durante 10 días de almacenamiento. Sin embargo, en estudios previos del grupo realizados en frutillas cv. Camarosa, se observó un retardo en el ablandamiento durante el almacenamiento refrigerado de los frutos tratados con $11,9 \text{ J.cm}^{-2}$ de LP, y una mejora en la firmeza (mayor F_R y W) cuando se aplicó una dosis de $23,9 \text{ J.cm}^{-2}$ (Duarte-Molina y col., 2016). Estos resultados ponen en evidencia que el impacto de los tratamientos con luz pulsada sobre los parámetros de calidad sería también dependiente del cultivar.

Tabla 4.30. Parámetros mecánicos de frutillas control y tratadas con luz pulsada durante el almacenamiento a $5 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$.

Tratamiento	Día	F_R (N)	D (%)	W (mJ)	Ed (mPa)	
Control	0	$2,3 \pm 0,6$	$12,3 \pm 2,5$	$4,0 \pm 1,4$	$12,4 \pm 3,4$	a
	4	$2,3 \pm 0,7$	$10,9 \pm 1,8$	$4,3 \pm 1,6$	$14,5 \pm 3,3$	b
	8	$2,0 \pm 0,7$	$11,7 \pm 2,4$	$4,2 \pm 1,5$	$12,4 \pm 4,1$	b
LP $11,9 \text{ J.cm}^{-2}$	0	$2,1 \pm 0,7$	$10,4 \pm 1,8$	$3,3 \pm 1,4$	$13,5 \pm 3,7$	a
	4	$2,2 \pm 0,7$	$11,3 \pm 2,6$	$4,4 \pm 1,8$	$14,2 \pm 3,4$	b
	8	$2,2 \pm 0,8$	$12,7 \pm 2,4$	$4,7 \pm 1,6$	$11,4 \pm 3,5$	b
LP $23,9 \text{ J.cm}^{-2}$	0	$2,3 \pm 0,8$	$11,3 \pm 2,4$	$3,7 \pm 1,8$	$12,9 \pm 3,3$	a
	4	$2,4 \pm 0,7$	$11,8 \pm 2,7$	$4,7 \pm 1,8$	$13,8 \pm 3,4$	b
	8	$2,2 \pm 0,7$	$11,4 \pm 2,9$	$4,2 \pm 1,7$	$12,8 \pm 3,1$	b

Los valores representan el promedio \pm desvío estándar.

Promedios seguidos de distinta letra minúscula difieren significativamente ($p < 0,05$).

Tabla 4.31. Resultados del MANOVA para los parámetros mecánicos de frutillas control y tratadas con LP durante el almacenamiento a 5 ± 1 °C.

Fuente	Estadístico	GL	F	p-valor
Día	0,41	4	28,49	<0,0001
Tratamiento	0,03	4	2,17	0,0732
Tratamiento*Día	0,06	4	3,87	0,0045
Error		277		

4.1.2.3 Integración de resultados de la Sección 4.1.2

Esta sección tuvo como fin evaluar el efecto de la luz pulsada en la vida postcosecha de frutillas cv. Albion, comparar los resultados obtenidos con los conocimientos previos del grupo sobre un cultivar diferente y, de ser posible, elegir las dosis con mejor desempeño en los parámetros evaluados a ser combinados con la dosis seleccionada de ozono en fase acuosa, discutida en secciones previas.

Por un lado, y reforzando la literatura existente sobre el tema, se establece la clara dependencia de los efectos del tratamiento con luz pulsada con el cultivar del fruto utilizado. Al mismo tiempo, esto permite tener una idea más clara del potencial de algunas dosis como tratamientos postcosecha. En este sentido, pese a las diferencias observadas entre este trabajo y el realizado por Duarte-Molina y col. (2016), para ambos cultivares la dosis con mejor desempeño sería la de 20 s ($23,9 \text{ J.cm}^{-2}$). Esta dosis, si bien no logró retardar o disminuir el ablandamiento de los frutos cv. Albion durante el almacenamiento, si logró disminuir el nivel de infección tanto por la microbiota nativa como por *Botrytis cinerea* durante el almacenamiento.

Duarte-Molina y col. (2016) también evaluaron el efecto del tratamiento en ciertos aspectos de calidad (parámetros mecánicos, micro y ultraestructura, color, pérdida de peso, entre otros). Además, Escobar-Tobar (2017) evaluó el efecto de la LP en el contenido de compuestos bioactivos y capacidad antioxidante de frutillas cv. Camarosa. De acuerdo a lo discutido en esta sección, el efecto del tratamiento con luz pulsada puede diferir entre distintos cultivares de frutillas. No obstante, ciertos parámetros de calidad no fueron evaluados en este trabajo para frutillas cv. Albion, ya que el objetivo principal de esta sección era la selección de las dosis de luz pulsada a aplicar en forma combinada

con otras tecnologías, más que la caracterización de la respuesta de distintos cultivares a la irradiación con luz pulsada.

De acuerdo a los resultados hasta aquí descritos, la dosis de luz pulsada de 20 s resultaría la más conveniente en vistas del desempeño mostrado en los ensayos microbiológicos. Sin embargo, teniendo en cuenta que la combinación de distintos factores de estrés tiene como objeto disminuir las dosis o tiempos de exposición con el fin de minimizar posibles alteraciones en los parámetros de calidad, se decidió evaluar ambas dosis de luz pulsada con el tratamiento de ozono en fase acuosa de 5 min.

4.2 Tecnologías alternativas aplicadas en forma combinada previo al almacenamiento refrigerado: Combinación ozono en fase acuosa – luz pulsada

4.2.1 Efecto de los tratamientos combinados sobre la respuesta microbiana

4.2.1.1 Evolución de la micoflora nativa

En la **Figura 4.26** y la **Tabla 4.32** se muestra la evolución del porcentaje de frutos infectados correspondientes a los tratamientos individuales, combinados y control durante el almacenamiento refrigerado. Los datos del porcentaje de frutos infectados fueron transformados con la función arcoseno para que cumplieran con los supuestos del análisis de varianza. Dicha transformación es la recomendada cuando la variable a analizar es una proporción. Los resultados del análisis estadístico se muestran en la **Tabla 4.33**.

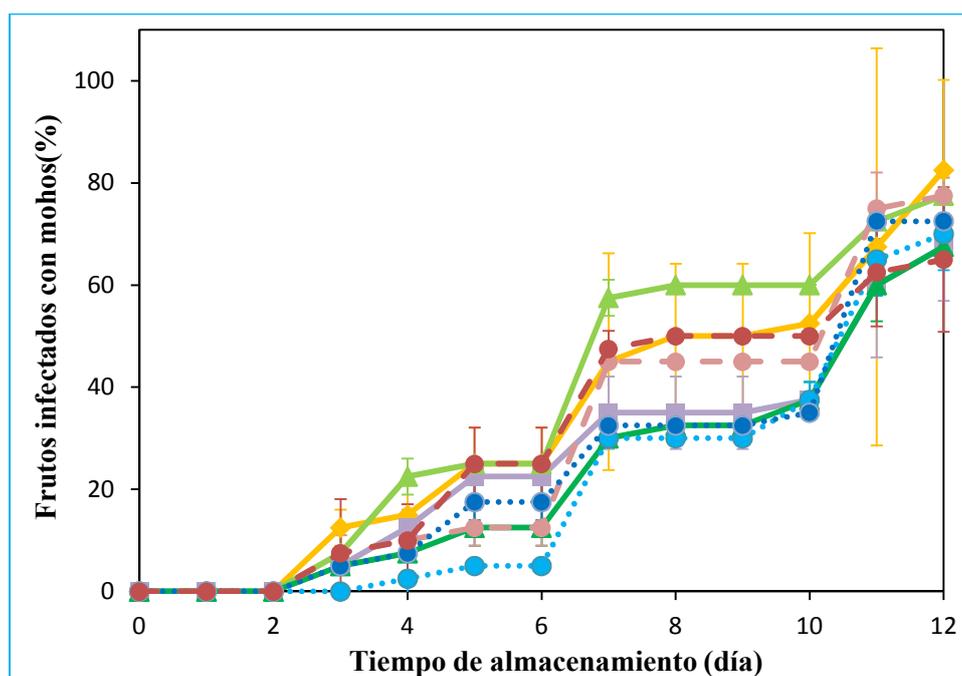


Figura 4.26. Porcentaje de frutos infectados (micoflora nativa) durante el almacenamiento a 5 ± 1 °C. (■) Control, (■) 5 min O₃, (▲) LP 11,9 J.cm⁻², (▲) LP 23,9 J.cm⁻², (●) combinación O₃ – LP 11,9 J.cm⁻², (●) combinación O₃ – LP 23,9 J.cm⁻², (●) LP 11,9 J.cm⁻² – combinación O₃, (●) LP 23,9 J.cm⁻² – combinación O₃. Los valores representan el promedio y las barras verticales la desviación estándar.

Tabla 4.32. Evolución del porcentaje de frutos infectados por la micoflora nativa de frutillas control y tratadas con ozono y luz pulsada, en forma individual o combinada, durante el almacenamiento a 5 ± 1 °C.

Tratamiento	Tiempo de almacenamiento (día)				
	4	6	8	10	
Control	15,0 ± 7,1	25,0 ± 7,1	50,0 ± 14,1	52,5 ± 17,7	a, b
O ₃	12,5 ± 3,5	22,5 ± 3,5	35,0 ± 7,1	37,5 ± 3,5	c, e
LP 11,9 J.cm ⁻²	22,5 ± 3,5	25,0 ± 0,0	60,0 ± 0,0	60,0 ± 0,0	b
LP 23,9 J.cm ⁻²	7,5 ± 3,5	12,5 ± 3,5	32,5 ± 3,5	37,5 ± 3,5	c
O ₃ – LP 11,9 J.cm ⁻²	2,5 ± 3,5	5,0 ± 0,0	30,0 ± 0,0	37,5 ± 3,5	d
O ₃ – LP 23,9 J.cm ⁻²	7,5 ± 3,5	17,5 ± 3,5	32,5 ± 3,5	35,0 ± 0,0	c
LP 11,9 J.cm ⁻² - O ₃	10,0 ± 0,0	12,5 ± 3,5	45,0 ± 0,0	45,0 ± 0,0	c, e
LP 23,9 J.cm ⁻² - O ₃	10,0 ± 7,1	25,0 ± 7,1	50,0 ± 0,0	50,0 ± 0,0	a, e
	A	B	C	C	

Los valores fueron expresados como el promedio de cada tratamiento ± desviación estándar.

Los tratamientos seguidos por distinta letra minúscula difieren significativamente ($p < 0,05$).

Los días de almacenamiento con distinta letra mayúscula difieren significativamente ($p < 0,05$).

Tabla 4.33. Resultados del ANOVA para la evolución del porcentaje de frutos infectados por micoflora nativa de frutillas control y tratadas con ozono y luz pulsada, en forma individual o combinada, durante el almacenamiento a 5 ± 1 °C.

Fuente	CM	GL	F	p-valor
Día	0,66	3	138,51	< 0,0001
Tratamiento	0,07	7	15,51	< 0,0001
Tratamiento*Día	0,01	21	1,07	0,4250
Error	0,005	32		
R ² _{aj}	0,89			

La interacción entre los factores "tratamiento" y "tiempo de almacenamiento" no resultó significativa ($F_{21, 32} = 1,07$, $p = 0,4250$) mientras que los efectos principales de ambos factores sí lo fueron (**Tabla 4.33**).

Todas las muestras analizadas mostraron un incremento del porcentaje de frutos infectados a lo largo del almacenamiento. En concordancia con los resultados de las **Secciones 4.1.1.2.1 y 4.1.2.1.1**, los tratamientos individuales de ozono (5 min) y la mayor dosis de luz pulsada ($23,9 \text{ J.cm}^{-2}$) redujeron significativamente el porcentaje de frutos infectados respecto al control durante el almacenamiento. De todos los tratamientos evaluados sólo uno logró retardar la aparición de infección en un día; se trata de la combinación $\text{O}_3 - 11,9 \text{ J.cm}^{-2} \text{ LP}$, que mantuvo además uno de los menores niveles de infección durante el almacenamiento.

Por otra parte, pudo observarse que el orden en que fueron aplicados los factores de estrés en los tratamientos combinados tuvo una incidencia significativa en la inhibición del desarrollo de la microbiota nativa. Cuando el orden de aplicación de factores fue tratamiento de ozono seguido de luz pulsada, se obtuvo mayor inhibición que en la secuencia contraria.

De todas las combinaciones evaluadas, la que resultó más efectiva en la reducción del nivel de infección fue la combinación $\text{O}_3 - \text{LP } 11,9 \text{ J.cm}^{-2}$; sin embargo, las diferencias respecto a los tratamientos individuales dependieron del período de almacenamiento estudiado. Durante los primeros días, los tratamientos combinados presentaron el menor porcentaje de frutos infectados, junto con el tratamiento individual de luz pulsada ($23,9 \text{ J.cm}^{-2}$). Al día 6, el menor nivel de infección observado correspondió a la combinación $\text{O}_3 - \text{LP } 11,9 \text{ J.cm}^{-2}$, que resultó un 7 % menor respecto al tratamiento individual de luz pulsada ($23,9 \text{ J.cm}^{-2}$) y un 20 % menor al control. Sin embargo, en los días posteriores del almacenamiento, las diferencias observadas entre tratamientos se minimizaron, resultando los niveles de infección de la combinación 5 min $\text{O}_3 - \text{LP } 11,9 \text{ J.cm}^{-2}$ similares al de los tratamientos individuales de ozono y de la dosis de $23,9 \text{ J.cm}^{-2}$ de luz pulsada, que al día 8 presentaron un porcentaje de frutos infectados del 30, 35 y 32,5 %, respectivamente.

Al final del almacenamiento (día 12) las diferencias entre los porcentajes de frutos infectados de los tratamientos mencionados no superaron el 12,5 %, y el 15 % respecto al control.

En vistas de estos resultados, la elección de un tratamiento combinado por sobre los tratamientos individuales dependería de la vida útil pretendida. Hasta los primeros 6 días de almacenamiento resultaría conveniente, desde el punto de vista de la disminución del nivel de infección, la combinación $\text{O}_3 - \text{LP } 11,9 \text{ J.cm}^{-2}$ por sobre los tratamientos individuales. Sin embargo, al extender 2 días el almacenamiento, la complejidad de

utilizar dos tecnologías no justificaría un 2,5 % de diferencias entre la reducción que se obtendría respecto al tratamiento individual de luz pulsada ($23,9 \text{ J.cm}^{-2}$).

4.2.2 Efecto de los tratamientos combinados sobre las propiedades mecánicas

Los perfiles de punción característicos de frutillas tratadas y control a los 0 y 8 días de almacenamiento se presentan en las **Figuras 4.27** y **4.28**, respectivamente. Como puede observarse en la figura correspondiente al día 0, la curva Fuerza versus Deformación presentó un incremento lineal hasta llegar al punto de ruptura de la epidermis (F_R), tanto en el control como en los frutos tratados. El resto del perfil correspondió al avance de la punta en el receptáculo, presentando iguales características a las descritas en la **Sección 4.1.1.5**. Luego de 8 días de almacenamiento, los perfiles de punción no sufrieron grandes cambios respecto al día 0 en la zona correspondiente al epicarpio pero si hubo modificaciones en las otras partes del receptáculo, que fueron descritas en la **Sección 4.1.2.2**.

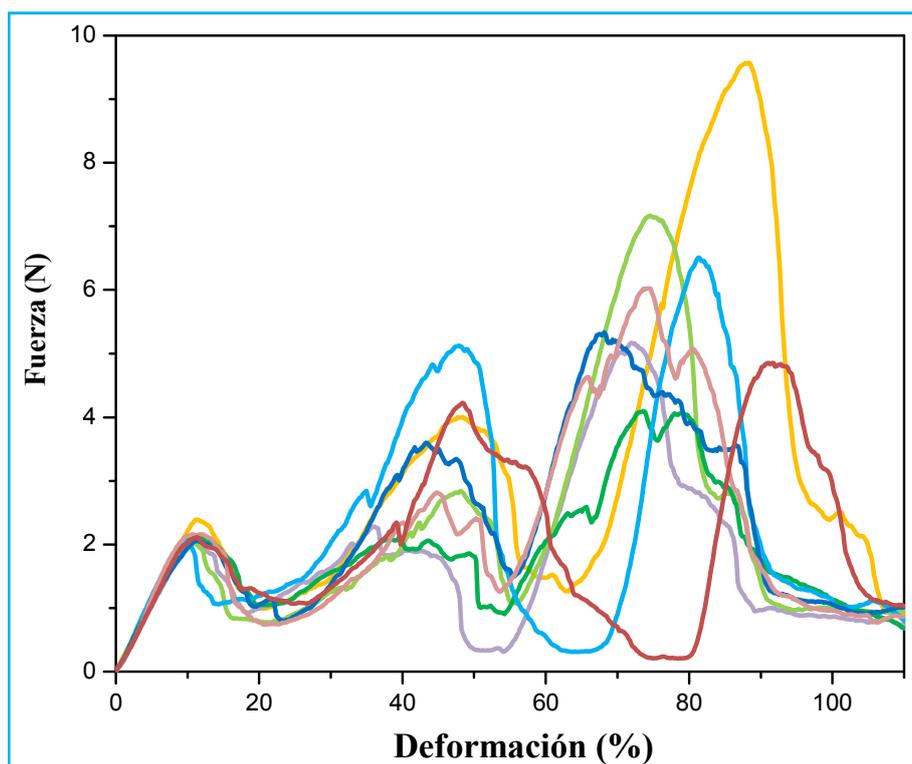


Figura 4.27. Perfiles característicos del ensayo de punción de frutillas control y tratadas al día 0 del almacenamiento a $5 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$. (—) control, (—) O_3 , (—) LP $11,9 \text{ J.cm}^{-2}$, (—) LP $23,9 \text{ J.cm}^{-2}$, (—) $\text{O}_3 - \text{LP } 11,9 \text{ J.cm}^{-2}$, (—) $\text{O}_3 - \text{LP } 23,9 \text{ J.cm}^{-2}$, (—) LP $11,9 \text{ J.cm}^{-2} - \text{O}_3$, (—) LP $23,9 \text{ J.cm}^{-2} - \text{O}_3$.

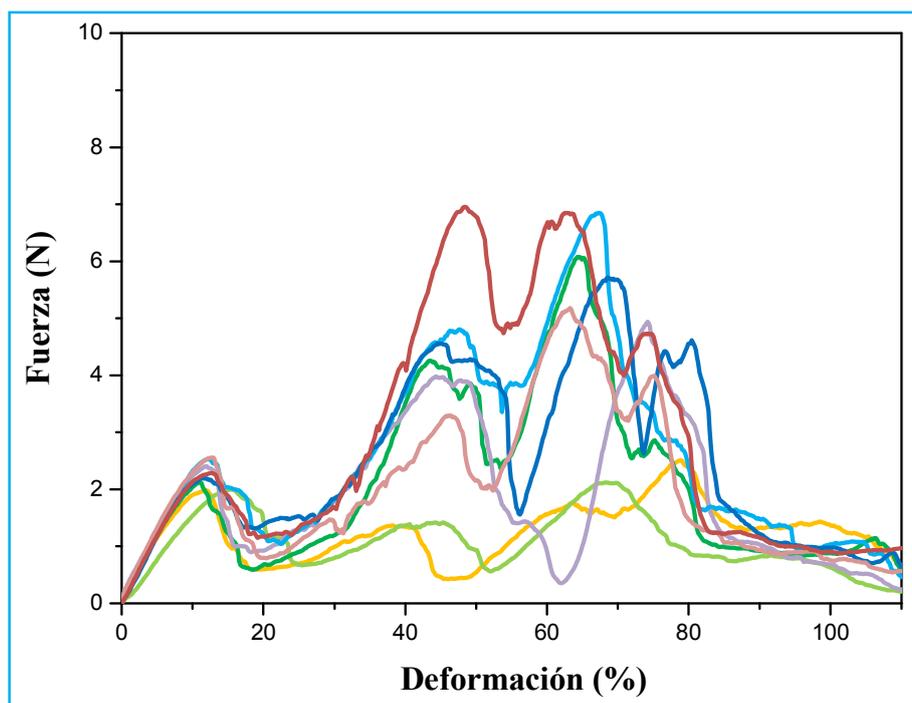


Figura 4.28. Perfiles característicos del ensayo de punción de frutillas control y tratadas al día 8 del almacenamiento a 5 ± 1 °C. (—) control, (—) O₃, (—) LP 11,9 J.cm⁻², (—) LP 23,9 J.cm⁻², (—)O₃ – LP 11,9 J.cm⁻², (—)O₃ – LP 23,9 J.cm⁻², (—) LP 11,9 J.cm⁻² – O₃, (—) LP 23,9 J.cm⁻² – O₃.

En la **Tabla 4.34** se presentan los resultados del ensayo de punción de frutillas control y tratadas con ozono, luz pulsada y la combinación de ambas tecnologías durante el almacenamiento. Para el análisis estadístico de los datos se decidió realizar la evaluación hasta los 8 días de almacenamiento, ya que un período mayor implicó la pérdida de un gran número de muestras debido a la infección microbiológica. El resultado del MANOVA correspondiente se presenta en la **Tabla 4.35**.

La interacción entre los factores "tratamiento" y "tiempo de almacenamiento" resultó significativa ($F_{14, 824} = 2,19$, $p = 0,0070$). Si bien se observaron leves diferencias entre los parámetros mecánicos de las muestras tratadas respecto al control inmediatamente después de realizados los tratamientos (día 0), las mismas no resultaron significativas ni tampoco lo fueron durante el almacenamiento. A diferencia de lo comentado para la inhibición de la flora nativa, el orden en que se aplicaron los factores de estrés no modificó significativamente los parámetros mecánicos de los frutos.

Tabla 4.34. Parámetros mecánicos de frutillas control, tratadas con ozono, luz pulsada y tratamientos combinados de ambas tecnologías, durante el almacenamiento refrigerado a 5 ± 1 °C.

Tratamiento	Día	F _R (N)	W (mJ)	D (%)	Ed (mPa)	
Control	0	2,4 ± 0,7	4,2 ± 1,7	12,6 ± 2,6	12,7 ± 3,8	a, b, c
	4	2,4 ± 0,8	4,6 ± 2,1	11,2 ± 2,0	14,6 ± 3,3	a, b, c
	8	2,0 ± 0,7	4,2 ± 1,6	12,1 ± 2,8	12,0 ± 4,3	a, b, c
O ₃	0	2,1 ± 0,7	3,5 ± 1,5	10,8 ± 2,3	12,9 ± 3,8	b, c
	4	2,4 ± 0,6	4,9 ± 1,7	11,7 ± 2,6	15,1 ± 3,7	a, b
	8	2,3 ± 0,7	4,6 ± 1,7	11,4 ± 2,8	14,0 ± 3,7	a, b, c
LP 11,9 J.cm ⁻²	0	2,1 ± 0,6	3,3 ± 1,4	10,4 ± 1,8	13,5 ± 3,6	c
	4	2,2 ± 0,7	4,5 ± 1,8	11,5 ± 2,9	14,3 ± 3,6	a, b
	8	2,1 ± 0,8	4,7 ± 1,5	13,4 ± 3,0	10,8 ± 3,6	a, b, c
LP 23,9 J.cm ⁻²	0	2,3 ± 0,7	3,9 ± 1,8	11,4 ± 2,4	13,0 ± 3,2	c
	4	2,5 ± 0,7	4,9 ± 2,0	12,1 ± 3,2	13,9 ± 4,0	a, b, c
	8	2,2 ± 0,8	4,4 ± 2,1	11,7 ± 3,1	12,8 ± 3,1	a, b, c
O ₃ – LP 11,9 J.cm ⁻²	0	2,1 ± 0,9	3,7 ± 2,3	10,6 ± 2,3	13,3 ± 4,3	c
	4	2,6 ± 0,9	5,3 ± 2,3	12,7 ± 3,2	15,0 ± 3,4	a
	8	2,4 ± 0,7	5,0 ± 2,2	12,3 ± 2,4	13,9 ± 4,3	a, b, c
O ₃ – LP 23,9 J.cm ⁻²	0	2,1 ± 0,8	3,7 ± 2,1	11,6 ± 2,7	11,8 ± 4,0	c
	4	2,2 ± 0,7	4,4 ± 1,9	11,5 ± 3,4	13,9 ± 3,7	a, b, c
	8	2,3 ± 0,9	4,5 ± 2,4	11,7 ± 3,4	14,6 ± 4,5	a, b
LP 11,9 J.cm ⁻² - O ₃	0	2,1 ± 0,7	3,6 ± 1,6	10,7 ± 1,6	13,3 ± 4,4	b, c
	4	2,6 ± 0,7	5,0 ± 2,2	12,3 ± 3,0	14,6 ± 3,8	a, b
	8	2,5 ± 0,8	5,2 ± 2,1	12,8 ± 2,6	14,1 ± 4,6	a, b, c
LP 23,9 J.cm ⁻² - O ₃	0	2,3 ± 0,9	4,1 ± 2,2	12,2 ± 2,8	11,9 ± 3,7	c
	4	2,7 ± 1,0	5,4 ± 2,4	12,1 ± 2,6	15,3 ± 3,9	a, b
	8	2,4 ± 0,8	4,8 ± 1,9	12,6 ± 3,7	13,6 ± 4,7	a, b, c

Promedios seguidos de distinta letra minúscula difieren significativamente ($p < 0,05$).

Tabla 4.35. Resultados del MANOVA para los parámetros mecánicos de frutillas control, tratadas con ozono, luz pulsada y tratamientos combinados de ambas tecnologías, durante el almacenamiento refrigerado a 5 ± 1 °C.

Fuente	Estadístico	GL	F	p-valor
Día	0,11	3	30,24	<0,0001
Tratamiento	0,02	7	2,36	0,0218
Tratamiento*Día	0,04	14	2,19	0,0070
Error		824		

Durante el almacenamiento, los frutos control mostraron una F_R constante hasta el cuarto día, que luego disminuyó levemente al día 8. Al día 4 se detectó un ligero incremento en el valor de E_d y una disminución en el valor de D ; ambos parámetros disminuyeron al final del almacenamiento. Ninguno de estos cambios durante el almacenamiento de los frutos control resultó significativo.

Los tratamientos individuales y algunas de las combinaciones estudiadas causaron también leves alteraciones en los parámetros mecánicos como consecuencia del almacenamiento refrigerado. La menor dosis de luz pulsada ($11,9 \text{ J.cm}^{-2}$) aplicada en forma individual mostró un aumento significativo de F_R , D y E_d al día 4; igual comportamiento mostraron los tratamientos combinados con esta misma dosis de luz pulsada. La combinación LP $23,9 \text{ J.cm}^{-2} - \text{O}_3$ exhibió a este tiempo de almacenamiento valores de F_R y E_d significativamente mayores con respecto al día 0. Sin embargo, tal como se mencionó previamente, al comparar entre tratamientos ó con el control, las diferentes tendencias de los parámetros mecánicos no resultaron significativas. Debe tenerse en cuenta que los parámetros analizados, F_R , D , W y E_d , corresponden sólo a la zona de la epidermis y no consideran la respuesta mecánica del resto del receptáculo, que mostrarían algunas diferencias entre los frutos tratados entre sí y con el control al día 0, las que se modificarían también por efecto del almacenamiento.

El estudio de la aplicación de factores emergentes de conservación a frutas y vegetales ha sido encarado y desarrollado en los últimos años, llegando a adoptarse en algunas aplicaciones a nivel industrial. Sin embargo, como se mencionó anteriormente, la efectividad de estos tratamientos suele asociarse, no sólo al efecto del/los factor(es) *per se* en los microorganismos, sino a la respuesta hormética que éste/estos inducen en

la matriz estudiada. Estas respuestas dependen por un lado, de las variables operativas utilizadas en el tratamiento (dosis, distancia a la lámpara, temperatura, concentración de ozono, entre otros) y por el otro, de factores biológicos del fruto como el cultivar, estado de cosecha y factores ambientales sobre el cultivo.

En este contexto, el estudio de la combinación de estos factores de estrés es aún más escaso y resulta dificultoso la comparación de los resultados al tratarse de distintas tecnologías a las aquí utilizadas, o bien, cuando alguna de ellas coincide, las dosis o matrices evaluadas son muy diferentes. Como ejemplos se pueden mencionar un estudio de Alexandre y col. (2011) realizado en frutillas, en el cual evaluaron el efecto combinado de ozono en fase acuosa ($0,3 \text{ mg.L}^{-1}$, 2 min) con un tratamiento térmico ($50 \text{ }^\circ\text{C}$, 1 min) sobre el recuento de mesófilos totales, para el cual obtuvieron un efecto aditivo entre los factores cuando la secuencia aplicada era ozono seguido de tratamiento térmico, mientras que, en la secuencia inversa la interacción fue antagónica. Jemni y col. (2014) evaluaron la combinación de ozono en fase acuosa con irradiación UV-C en dátiles, obteniendo mayores reducciones de mesófilos, coliformes, y hongos y levaduras en el caso de los tratamientos combinados.

En vista de los resultados obtenidos hasta aquí, en los cuales se demuestra que los tratamientos combinados (en las dosis evaluadas) no resultaron en una mejora importante respecto a los tratamientos individuales en cuanto a su efectividad para inhibir el desarrollo fúngico, especialmente a los mayores tiempos de almacenamiento, se decidió no continuar con los ensayos de calidad restantes e investigar otras combinaciones que se desarrollarán en la siguiente sección.

4.2.3 Integración de los resultados de la Sección 4.2.1

El estudio de la combinación de los tratamientos de ozono y luz pulsada demostró que las combinaciones no lograron mejorar los resultados obtenidos con los tratamientos individuales en términos generales, a excepción de la combinación $\text{O}_3 - \text{LP}$ $11,9 \text{ J.cm}^{-2}$ que, si bien presentó una leve pero significativa mejora en la inhibición del desarrollo fúngico, no justificaría los costos de operación en una posible aplicación a mayor escala. Se demostró que la secuencia en la cual se realizan los tratamientos tuvo un efecto significativo en la inhibición de la microbiota nativa, resultando más efectiva la secuencia ozono seguida de luz pulsada. Por último, ninguno de los tratamientos combinados condujo a una modificación en los parámetros mecánicos de la epidermis respecto a los tratamientos individuales ó a los frutos control.

Si bien no es posible recomendar las combinaciones específicas aquí estudiadas, no debe desestimarse el uso de ozono y luz pulsada en un enfoque multifactorial, sino que es necesario refinar la búsqueda de las dosis correctas de ambos tratamientos que logren un efecto antimicrobiano aditivo o sinérgico más efectivo, teniendo en cuenta que la secuencia de aplicación sería tratamiento con ozono seguido de aplicación de luz pulsada. Esta secuencia resulta conveniente además pensando en la dinámica de un proceso industrializado, donde se aplique en primer lugar una técnica de lavado al fruto proveniente del campo, secado y un tratamiento final de luz pulsada previo a su empaque final.

4.3 Tecnologías alternativas y tradicionales aplicadas en forma combinada previo al almacenamiento refrigerado: Combinación tratamiento térmico-luz pulsada

4.3.1 Determinación de los perfiles de temperatura

En la **Figura 4.29** se presentan los perfiles de temperatura obtenidos en el agua y en las frutillas durante el tratamiento térmico. En el caso de las frutillas, la temperatura fue registrada en dos posiciones diferentes, a 1 y 5 mm medidos desde la superficie del fruto, con el fin de evaluar el gradiente de temperatura dentro del mismo.

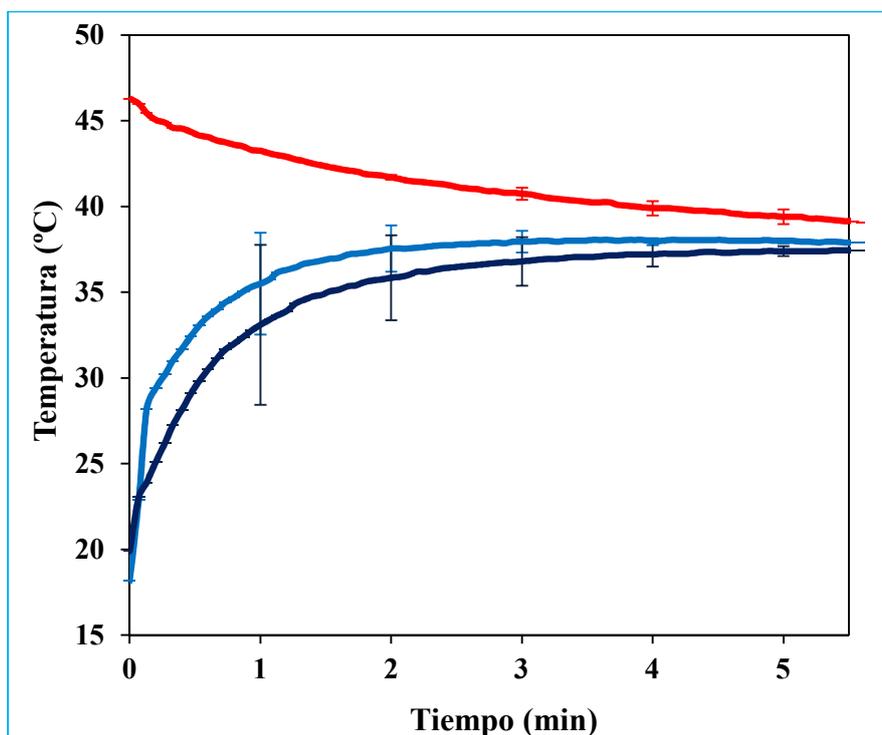


Figura 4.29. Perfiles de temperatura en el agua y en dos posiciones diferentes desde la superficie del fruto durante el tratamiento térmico. (—) agua, (—) a 1 mm de la superficie, (—) a 5 mm de la superficie. Las curvas representan los promedios y las barras verticales la desviación estándar.

Como se indicó en la **Sección 3.3.3.2**, la temperatura inicial del agua fue de $46,3 \pm 0,4$ °C, mientras que la de los frutos fue de $18,1 \pm 3,0$ °C. Se observó un aumento drástico de la temperatura durante los dos primeros minutos, alcanzándose los $37,8 \pm 1,3$ °C a una distancia de 1 mm de la superficie del fruto. Posteriormente, la temperatura continuó aumentando pero en forma más gradual hasta llegar a una temperatura máxima de $38,0 \pm 0,1$ °C, a los 2,5 min. En la parte más interna del fruto (5 mm) el aumento de la temperatura resultó menos pronunciado, alcanzando los $36,6 \pm 2,4$ °C luego de 2,5 min,

mientras que la temperatura final resultó igual a $37,4 \pm 0,3$ °C. El gradiente de temperatura dentro del fruto tendió a minimizarse a partir de los 3 min de tratamiento, momento en el cual la diferencia de temperaturas entre las dos posiciones evaluadas fue de aproximadamente 1 °C. La temperatura final del agua fue de $39,0 \pm 0,4$ °C.

4.3.2 Efecto de los tratamientos combinados sobre la respuesta microbiana

4.3.2.1 Evolución de la micoflora nativa de frutillas

La evolución del porcentaje de frutos infectados con la micoflora nativa durante el almacenamiento se presenta en la **Figura 4.30**. Todas las muestras mostraron un aumento del porcentaje de frutos infectados durante el almacenamiento.

En el control se observó infección ya en el tercer día de almacenamiento, al igual que en las muestras sometidas a un tratamiento térmico de 2,5 min (2,5 min TT). El tratamiento individual de 10 s de LP ($11,9 \text{ J.cm}^{-2}$) y sus combinaciones con ambos tratamientos térmicos (2,5 min TT - $11,9 \text{ J.cm}^{-2}$ y 5 min TT - $11,9 \text{ J.cm}^{-2}$) retardaron la aparición de infección en un día en relación al control, mientras que en las frutillas con un tratamiento térmico de 5 min (5 min TT) se registraron signos de infección después del día 6 de almacenamiento. Es menester mencionar el comportamiento no esperado de este lote respecto a los utilizados en las **Secciones 4.1.2.1.1** y **4.2.1**, donde la misma dosis de luz pulsada no condujo a una disminución significativa del nivel de infección durante el almacenamiento. Si bien en este lote podría asumirse que los frutos estarían más contaminados que los lotes mencionados, teniendo en cuenta la evolución del porcentaje de frutos infectados en el control (~ 100 % versus ~ 80 % a los 12 días, respectivamente), debe considerarse que la microbiota puede ser diferente, incluyendo la población de especies más sensibles a la irradiación con luz pulsada.

Los valores promedio para cada tratamiento y día de almacenamiento incluidos en el análisis estadístico se presentan en la **Tabla 4.36**. Los resultados del ANOVA se muestran en la **Tabla 4.37**. El análisis estadístico determinó que la interacción entre los factores "tratamiento" y "tiempo de almacenamiento" resultó no significativa ($F_{20, 30} = 0,70$, $p = 0,7984$), mientras que los efectos principales de ambos factores fueron significativos (**Tabla 4.37**).

Todos los tratamientos evaluados, aplicados en forma individual o combinada, lograron disminuir significativamente el porcentaje de frutos infectados respecto al control a lo largo del almacenamiento refrigerado.

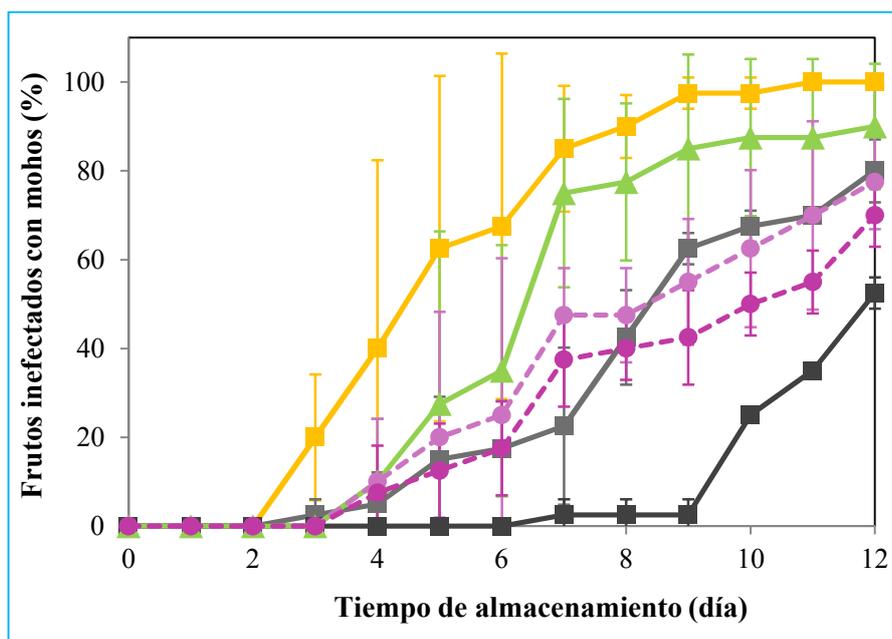


Figura 4.30. Porcentaje de frutos infectados (micoflora nativa) durante el almacenamiento a 5 ± 1 °C. (■) Control, (■) 2,5 min TT, (■) 5 min TT, (▲) LP $11,9 \text{ J.cm}^{-2}$, (●) combinación 2,5 min TT – LP $11,9 \text{ J.cm}^{-2}$, (●) combinación 5 min TT – LP $11,9 \text{ J.cm}^{-2}$. Los valores representan los promedios y las barras verticales la desviación estándar.

Tabla 4.36. Evolución del porcentaje de frutos infectados por la micoflora nativa de frutillas control y expuestas a tratamiento térmico y luz pulsada, en forma individual y combinada, durante el almacenamiento a 5 ± 1 °C.

Tratamiento	Tiempo de almacenamiento (día)					
	4	6	8	10	12	
Control	40,0 ± 42,4	67,5 ± 38,9	90,0 ± 7,1	97,5 ± 3,5	100,0 ± 0,0	a
LP $11,9 \text{ J.cm}^{-2}$	10,0 ± 14,1	35,0 ± 28,3	77,5 ± 17,7	87,5 ± 17,7	90,0 ± 14,1	b
2,5 min TT	5,0 ± 7,1	17,5 ± 10,6	42,5 ± 10,6	67,5 ± 3,5	80,0 ± 7,1	c
5 min TT	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	2,5 ± 3,5	25,0 ± 0,0	52,5 ± 3,5	d
2,5 min TT – LP $11,9 \text{ J.cm}^{-2}$	10,0 ± 14,1	25,0 ± 35,4	47,5 ± 10,6	62,5 ± 17,7	77,5 ± 10,6	c
5 min TT – LP $11,9 \text{ J.cm}^{-2}$	7,5 ± 10,6	17,5 ± 10,6	40,0 ± 7,1	50,0 ± 7,1	70,0 ± 7,1	c
	A	B	C	D	D	

Los valores fueron expresados como el promedio de cada tratamiento ± desviación estándar.

Los tratamientos seguidos por distinta letra minúscula difieren significativamente ($p < 0,05$).

Los días de almacenamiento con distinta letra mayúscula difieren significativamente ($p < 0,05$).

Tabla 4.37. Resultados del ANOVA para la evolución del porcentaje de frutos infectados por la micoflora nativa de frutillas control y expuestas a tratamiento térmico y luz pulsada, en forma individual y combinada, durante el almacenamiento a 5 ± 1 °C.

Fuente	CM	GL	F	p-valor
Día	8779,79	4	33,29	<0,0001
Tratamiento	4619,42	5	17,51	<0,0001
Tratamiento*Día	183,79	20	0,70	0,7984
Error	263,75	30		
R^2_{aj}	0,78			

Al comparar el nivel de infección de los distintos tratamientos, pudo observarse que ambas combinaciones presentaron una disminución significativa del nivel de infección durante el almacenamiento respecto al tratamiento individual de LP, que resultaron más evidentes al día 8, donde la diferencia entre el porcentaje de frutos infectados de las combinaciones 2,5 min TT – LP $11,9 \text{ J.cm}^{-2}$ y 5 min TT – LP $11,9 \text{ J.cm}^{-2}$ con el tratamiento individual de LP fueron del 30 y 37,5 %, respectivamente. La combinación 2,5 min TT – LP $11,9 \text{ J.cm}^{-2}$ presentó un nivel de infección levemente mayor (~ 15 - 20 %) que la combinación 5 min TT - LP durante todo el almacenamiento, aunque dichas diferencias no resultaron significativas. Si bien las combinaciones resultaron en una mejora respecto al tratamiento individual de luz pulsada, ninguna de ellas resultó en una mayor inhibición significativa respecto a los tratamientos térmicos aplicados individualmente. De todos los tratamientos evaluados, el que presentó la mayor reducción en el nivel de infección durante todo el período de almacenamiento estudiado fue el TT de 5 min que, como se mencionó anteriormente, también fue el que retardó la aparición de infección por 4 días respecto al control, y redujo el porcentaje de frutos infectados, alcanzando apenas el 2,5 % al día 8 del almacenamiento.

En resumen, la combinación de TT y LP si bien mostró ser más efectiva contra la microbiota nativa de las frutillas respecto al tratamiento de luz pulsada, no logró superar en forma significativa el desempeño de los tratamientos térmicos individuales de 2,5 y 5 min. Este último resultó ser el más eficaz en inhibir y retardar el desarrollo de la microbiota nativa de frutillas cv. Albion.

En un estudio realizado por Marquenie y col. (2003), en el cual evaluaron la combinación de tratamiento térmico moderado (45 °C) con luz pulsada para inhibir el

desarrollo de *Botrytis cinerea*, encontraron un efecto sinérgico en los tratamientos combinados, superando en 1 log a la suma de las reducciones alcanzadas con los tratamientos individuales, cuando la secuencia aplicada era tratamiento térmico seguido de luz pulsada. Sin embargo, en un estudio previo (Marquenie y col., 2002) reportaron que el mismo tratamiento térmico aplicado a frutillas cultivar Elsanta redujo la vida útil de las mismas, atribuyendo estos resultados a las heridas superficiales ocasionadas durante el tratamiento. En ese estudio evaluaron además, la combinación del tratamiento térmico con luz UV-C, encontrando que la mejor secuencia consistía en la irradiación de los frutos en primer lugar y con la mayor dosis evaluada (1 J.cm^{-2}) seguida por un tratamiento térmico de corta duración (3 min) a una temperatura levemente menor ($40 \text{ }^\circ\text{C}$). Si bien el tratamiento térmico utilizado en esta tesis es prácticamente el mismo, resulta difícil comparar las dosis de luz pulsada utilizadas ya que los autores mencionados no reportan las dosis aplicadas.

Por otra parte, diversos estudios han evaluado la efectividad de los tratamientos térmicos combinados con almacenamiento refrigerado para extender la vida útil de frutillas de diversos cultivares, evaluando además distintos parámetros de calidad. En un estudio realizado por Lara y col. (2006) en frutillas cultivar Pájaro inoculadas con *Botrytis cinerea*, la inmersión en agua a $45 \text{ }^\circ\text{C}$ durante 15 min prácticamente inhibió el desarrollo fúngico durante 10 días de almacenamiento a $3 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$. Sin embargo, al someter los frutos a aire caliente a igual temperatura durante 1 h y a 95 % de humedad relativa, si bien se redujo el nivel de infección respecto al control, no resultó tan efectivo como el tratamiento húmedo. En otro estudio más reciente realizado por Caleb y col. (2016) se evaluó el efecto de la inmersión de frutillas cultivar Sonata en agua a dos temperaturas y tiempos diferentes, 35 y $45 \text{ }^\circ\text{C}$ durante 5 y 10 min. De todas las combinaciones de temperatura y tiempos de exposición, el tratamiento a $45 \text{ }^\circ\text{C}$ durante 5 min fue el que logró una inhibición total del desarrollo de la micobiota nativa durante 12 días de almacenamiento a $4 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$, sin inducir lesiones superficiales que afectarían la apariencia del fruto para el consumidor. Jing y col. (2010) evaluaron tratamientos con temperaturas levemente superiores (55 , 60 y $65 \text{ }^\circ\text{C}$) durante 20 s seguido de almacenamiento a $0 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$, en este caso en frutillas del cultivar Feng xiang, y reportaron que temperaturas mayores a $60 \text{ }^\circ\text{C}$ producían serios daños en el aspecto de los frutos.

Todos los estudios mencionados demuestran que el tratamiento térmico puede ser viable para extender la vida postcosecha de frutillas, encontrando las combinaciones adecuadas de temperatura-tiempo para cada cultivar, en un rango de temperaturas y

tiempos determinados de manera de minimizar los efectos en la calidad visual de los frutos, que ocasionarían el rechazo del público consumidor.

La efectividad del tratamiento térmico ha sido atribuida a diversos factores, como la reducción de la actividad enzimática responsable de la degradación de la pared celular (Vicente y col., 2005), el efecto sobre el patógeno en sí y la redistribución de las ceras epicuticulares formando una capa homogénea que impida o dificulte la penetración del patógeno (Jing y col., 2010). Sin embargo, las temperaturas con las cuales se trabaja en este tipo de tratamientos no serían lo suficientemente elevadas como para afectar en forma directa a los microorganismos o a muchas de las enzimas, sino que la efectividad está asociada a la inducción de respuestas de defensa como consecuencia del estrés térmico al cual es sometido el fruto. Es decir, que el tratamiento térmico a las temperaturas mencionadas, no tendría un efecto directo sobre los microorganismos sino indirecto, al disparar una respuesta del tejido del fruto como consecuencia del estrés térmico. Al igual que en el caso de la aplicación de ozono y luz pulsada, este tipo de respuesta es dosis-dependiente (temperatura y tiempo de tratamiento), y dependería además del cultivar, el grado de maduración del fruto al momento de aplicar los tratamientos y las condiciones de almacenamiento posteriores (Lurie y col., 2014; Sui y col., 2016).

4.3.3 Efecto de los tratamientos sobre el color

Como se mencionó anteriormente en la **Sección 3.7**, sólo pudieron evaluarse las propiedades ópticas de los frutos sometidos a tratamiento térmico individual durante el almacenamiento refrigerado, debido a un desperfecto en el equipo de luz pulsada que imposibilitó continuar realizando ensayos con el mismo. La evaluación se realizó hasta el día 8 de almacenamiento, ya que al día 12 algunos tratamientos presentaron un elevado número de frutos infectados. Para el análisis de los datos mediante MANOVA y PCA, se utilizaron los parámetros colorimétricos L, a* y b*, dado que la función C* presentó un elevado grado de correlación con las variables a* y b*. Los coeficientes de correlación de Pearson entre C* con las variables a* y b* fueron de 0,98 y 0,90, respectivamente.

En la **Tabla 4.38** se presentan los resultados de la determinación de las propiedades ópticas de frutillas sometidas a tratamiento térmico con el correspondiente resultado del contraste de Hotelling corregido por Bonferroni. En la **Tabla 4.39**, se presenta el resultado del MANOVA.

Tabla 4.38. Parámetros y funciones colorimétricos de frutillas control y sometidas a tratamiento térmico individual durante el almacenamiento refrigerado a $5 \pm 1^\circ \text{C}$.

Tratamiento	Día	L*	a*	b*	C	h	
Control	0	32,5 ± 2,1	37,4 ± 2,1	19,9 ± 2,8	42,4 ± 2,8	27,7 ± 2,9	a
	4	32,4 ± 2,6	37,1 ± 3,1	19,7 ± 3,2	42,2 ± 3,9	27,7 ± 2,9	a
	8	33,0 ± 2,0	32,9 ± 3,6	16,1 ± 3,0	36,7 ± 4,3	25,8 ± 3,1	b
2,5 min TT	0	31,1 ± 2,5	34,4 ± 4,9	17,2 ± 4,3	38,6 ± 5,9	26,2 ± 4,3	a
	4	31,2 ± 2,3	33,0 ± 5,4	15,7 ± 4,2	36,6 ± 6,6	24,9 ± 3,0	a,b,c
	8	32,2 ± 2,2	30,6 ± 5,3	15,1 ± 3,7	34,3 ± 6,0	25,9 ± 4,5	b,c
5 min TT	0	32,2 ± 2,6	31,5 ± 4,6	15,8 ± 3,7	35,5 ± 5,3	26,3 ± 4,2	b,c
	4	30,3 ± 2,1	30,0 ± 4,9	14,5 ± 3,5	33,4 ± 5,8	25,6 ± 3,4	c
	8	30,8 ± 2,0	28,5 ± 4,9	14,1 ± 3,2	31,9 ± 5,5	26,2 ± 4,1	c

Los valores fueron expresados como el promedio de cada tratamiento ± desviación estándar. Los tratamientos seguidos por distinta letra minúscula difieren significativamente ($p < 0,05$).

Tabla 4.39. Resultados del MANOVA para las propiedades ópticas de frutillas control y sometidas a tratamiento térmico individual durante el almacenamiento a $5 \pm 1^\circ \text{C}$.

Fuente	Estadístico	GL	F	p-valor
Día	0,24	3	16,88	<0,0001
Tratamiento	0,32	3	22,37	<0,0001
Tratamiento*Día	0,13	4	7,15	<0,0001
Error		212		

La interacción entre los factores “tratamiento” y “tiempo de almacenamiento” resultó significativa ($F_{4, 212} = 7,15, p < 0,0001$).

Las frutillas no tratadas presentaron cambios significativos en los parámetros colorimétricos al día 8 del almacenamiento. Estos cambios se asociaron con un leve aumento de la luminosidad y, en mayor medida, con una disminución en los parámetros a^* y b^* . Las funciones C^* y h también se redujeron, en concordancia con las modificaciones observadas en a^* y b^* . Si bien los frutos tratados térmicamente durante 2,5 min, presentaron valores menores en estos parámetros en relación al control a lo largo del almacenamiento, estas diferencias no fueron significativas. Por el contrario, en los frutos expuestos a un tratamiento térmico más severo (5 min) se observaron variaciones significativas, que se evidenciaron inmediatamente después de aplicar el tratamiento (día 0). Estos cambios se relacionaron fundamentalmente con menores valores de a^* , b^* y C^* . Los menores valores de a^* y C^* indicarían una menor intensidad del color rojo y un color menos vívido para los frutos tratados térmicamente.

Caleb y col. (2016) observaron un aumento de la luminosidad y una disminución de a^* y h ($\sim 36 - 25 \%$, para a^* y h , respectivamente) en frutillas del cultivar Sonata luego de 6 días de almacenamiento a $4 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$, y posteriormente un incremento en a^* y h al día 12 de almacenamiento, 3 días después de haber aumentado la temperatura de almacenamiento a $16 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$. Ese incremento resultó en diferencias significativas entre los frutos tratados a $45 \text{ }^\circ\text{C}$ durante 5 min y los frutos control. Además de las diferentes tendencias mostradas en este estudio, la magnitud de los cambios encontrados por Caleb y col. (2016) fueron significativamente mayores a las reportadas en esta tesis. Jing y col. (2010) observaron un incremento en L y a^* en frutillas sujetas a tratamiento térmicos ($55, 60$ y $65 \text{ }^\circ\text{C}$, 20 s), mientras que h disminuyó luego de 12 días de almacenamiento a $0 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$. No se observaron diferencias significativas entre las distintas condiciones de tratamiento aunque todas ellas resultaron diferentes al control. En este estudio, sin embargo, partieron de frutos con un 80% de color rojo.

4.3.4 Efecto del tratamiento sobre la pérdida de peso

Los resultados correspondientes a la pérdida de peso de frutillas tratadas y control durante el almacenamiento se presentan en la **Figura 4.31**. En la **Tabla 4.40** se presenta el resultado del ANOVA correspondiente a los datos de pérdida de peso. La interacción entre los factores "tratamiento" y "tiempo de almacenamiento" resultó significativa ($F_{10, 323} = 4,63, p < 0,0001$).

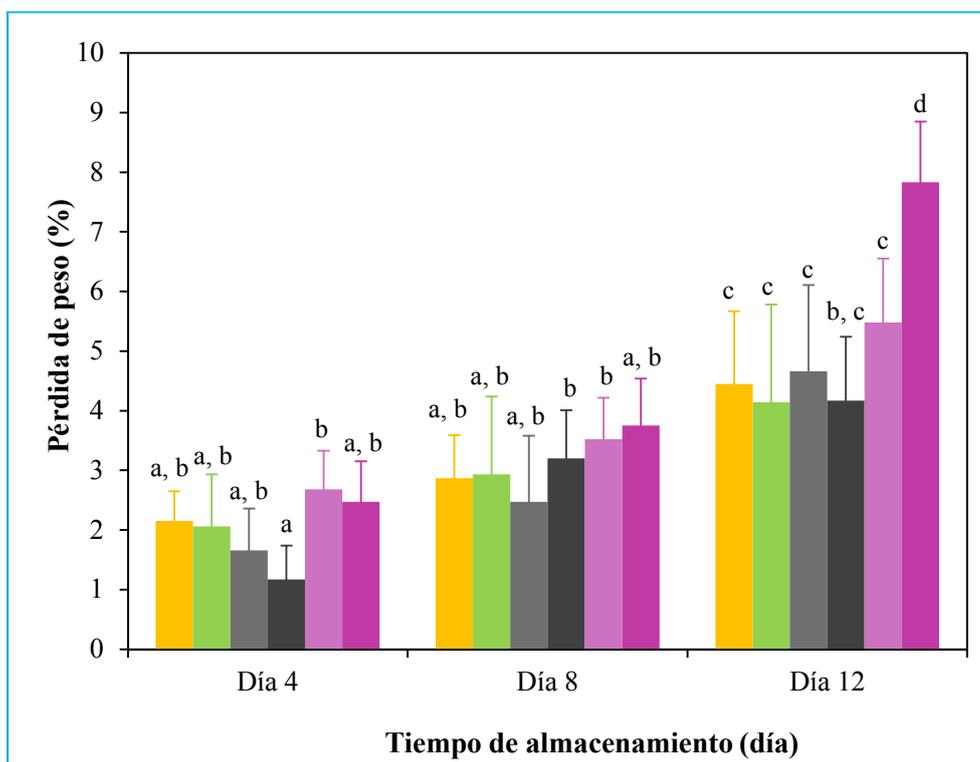


Figura 4.31. Porcentaje de pérdida de peso de frutillas tratadas y control durante el almacenamiento a 5 ± 1 °C. (■) Control, (■) 2,5 min TT, (■) 5 min TT, (▲) LP 11,9 J.cm⁻², (●) combinación 2,5 min TT – LP 11,9 J.cm⁻², (●) combinación 5 min TT – LP 11,9 J.cm⁻². Las columnas representan el promedio de cada tratamiento y las barras la desviación estándar. Promedios seguidos de distinta letra minúscula difieren significativamente ($p < 0,05$).

Tabla 4.40. Resultados del ANOVA para la pérdida de peso de frutos control y sometidos a tratamiento térmico y de luz pulsada, en forma individual o combinada, y almacenados a 5 ± 1 °C.

Fuente	CM	GL	F	p-valor
Día	368,24	2	213,33	<0,0001
Tratamiento	29,49	5	17,09	<0,0001
Tratamiento*Día	8,00	10	4,63	<0,0001
Error	1,73	323		
R ² _{aj}	0,63			

Se observó un aumento de la pérdida de peso durante el almacenamiento en todas las muestras, que en general resultó significativo al día 12, a excepción de los frutos sometidos a tratamiento térmico durante 5 min, en los cuales el incremento en la pérdida de peso fue significativo al día 8.

Los tratamientos individuales no presentaron diferencias significativas respecto al control a lo largo del almacenamiento. En el caso del tratamiento térmico, tampoco se observaron diferencias significativas entre los dos tiempos de exposición evaluados. Por último, los tratamientos combinados no presentaron modificaciones significativas en el porcentaje de pérdida de peso en relación al control hasta el final del almacenamiento, excepto en la combinación 5 min TT - $11,9 \text{ J.cm}^{-2}$ que al día 12 presentó una pérdida de peso significativamente superior a la del resto de los tratamientos y al control. El porcentaje de pérdida de peso alcanzado por este tratamiento combinado fue de aproximadamente el 8 % al día 12, superando por dos unidades el límite de aceptabilidad del consumidor, 6% (Nunes y col., 2007). Sin embargo, cabe señalar que hasta el día 8 ninguna de las muestras evaluadas superó este valor.

En resumen, ninguno de los tratamientos evaluados conllevó a un aumento significativo de este parámetro en relación al control hasta el octavo día de almacenamiento. Más aún, extendiendo el almacenamiento hasta 12 días, sólo la combinación 5 min TT - $11,9 \text{ J.cm}^{-2}$ incrementó la pérdida de peso por fuera de los límites aceptables.

Resultados similares respecto al efecto del tratamiento térmico en la pérdida de peso de frutillas cv. Pájaro fueron reportados por Lara y col. (2006). Dichos autores, al someterlas a tratamiento con aire a $45 \text{ }^\circ\text{C}$ durante 15 min y almacenarlas 10 días a $3 \text{ }^\circ\text{C}$, no encontraron diferencias significativas entre los frutos tratados y el control. Por el contrario, García y col. (1995) reportaron una reducción significativa en la pérdida de peso de frutillas cv. Tudla sumergidas durante 15 minutos a 35 y $45 \text{ }^\circ\text{C}$, y almacenadas 2 días a $1 \text{ }^\circ\text{C}$. Caleb y col. (2016) reportaron un incremento significativo de la pérdida de peso de frutillas cv. Sonata tratadas durante 5 min con agua a $45 \text{ }^\circ\text{C}$ luego de 9 días de almacenamiento a $4 \text{ }^\circ\text{C}$ y 3 días a $16 \text{ }^\circ\text{C}$. En forma similar, Vicente y col. (2002) no encontraron diferencias entre la pérdida de peso de frutillas cv. Selva sin tratar y sometidas a tratamiento térmico con aire a $45 \text{ }^\circ\text{C}$ durante 3 horas, luego de 7 días de almacenamiento a $0 \text{ }^\circ\text{C}$. Sin embargo, cuando se extendió el tiempo de almacenamiento a $0 \text{ }^\circ\text{C}$ hasta 14 días y se incubaron posteriormente 48 h a $20 \text{ }^\circ\text{C}$, la pérdida de peso de los frutos tratados resultó significativamente superior a la del control.

Las diferentes tendencias observadas entre los autores y este trabajo podrían relacionarse con la utilización de frutillas de diferentes cultivares, el tipo de tratamiento térmico (aire o agua caliente, temperatura, tiempo de exposición) y las condiciones de almacenamiento.

En coincidencia con nuestros resultados, Duarte-Molina y col. (2016) también observaron una reducción no significativa de la pérdida de peso de frutillas cv. Camarosa, luego de haber sido irradiadas con luz pulsada ($11,9 \text{ J.cm}^{-2}$) y almacenadas 8 días a $5 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$, con respecto al control.

4.3.5 Efecto del tratamiento sobre las propiedades mecánicas

Los perfiles de punción característicos de frutillas tratadas y control a los 0 y 8 días de almacenamiento se presentan en las **Figuras 4.32** y **4.33**, respectivamente.

Como puede observarse en las figuras correspondientes a los días 0 y 8, la curva Fuerza versus Deformación presentó un incremento lineal hasta llegar al punto de ruptura de la epidermis (F_R), tanto en el control como en los frutos tratados. Luego de 8 días de almacenamiento, los perfiles de punción mostraron algunas diferencias con respecto al día 0, más notorias en la zona del interior del receptáculo. En ambos casos presentaron características similares a las descritas en las **Secciones 4.1.1.5** y **4.1.2.2**.

En la **Tabla 4.41** se presentan los valores de los parámetros mecánicos obtenidos de las diferentes curvas de punción de frutillas tratadas y control a lo largo del almacenamiento refrigerado. El análisis estadístico correspondiente se presenta en la **Tabla 4.42**. Los datos fueron transformados con la función logaritmo para cumplir con los supuestos del MANOVA. La interacción entre los factores “tratamiento” y “tiempo de almacenamiento” resultó significativa ($F_{10,614} = 7,54$, $p < 0,0001$).

Al día 0, ninguno de los tratamientos evaluados, individuales o combinados, modificaron en forma significativa los parámetros mecánicos con respecto al control.

El almacenamiento refrigerado tuvo un efecto significativo en los frutos control que se evidenció al día 8 y que se caracterizó principalmente por un aumento de D. Sin embargo, debe notarse que los valores de los parámetros presentan desviaciones estándar grandes, que reflejarían la gran variabilidad de la materia prima.

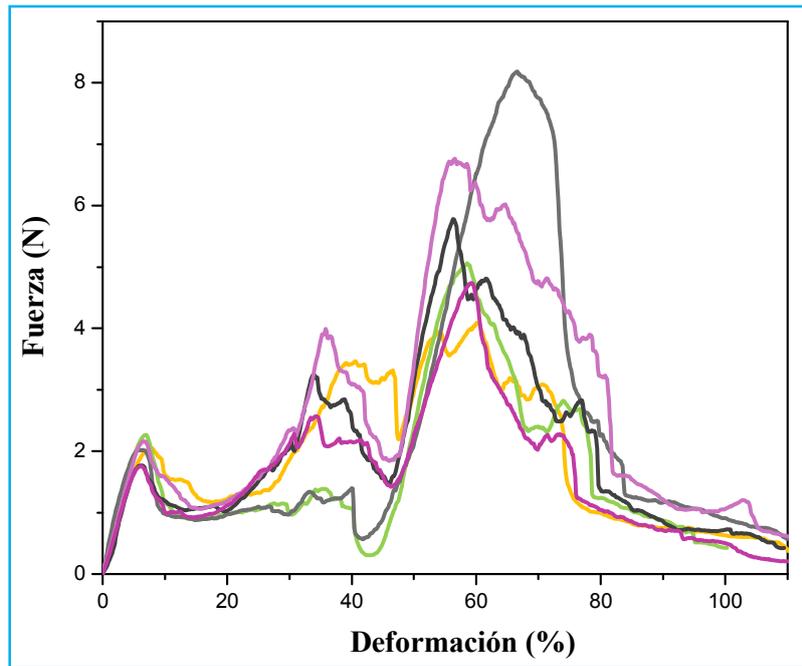


Figura 4.32. Perfiles característicos del ensayo de punción de frutillas control y tratadas a los 0 días de almacenamiento. (—) control, (—) LP 11,9 J.cm⁻², (—) 2,5 min TT, (—) 5 min TT, (—) combinación 2,5 min TT – LP 11,9 J.cm⁻², (—) combinación 5 min TT – LP 11,9 J.cm⁻².

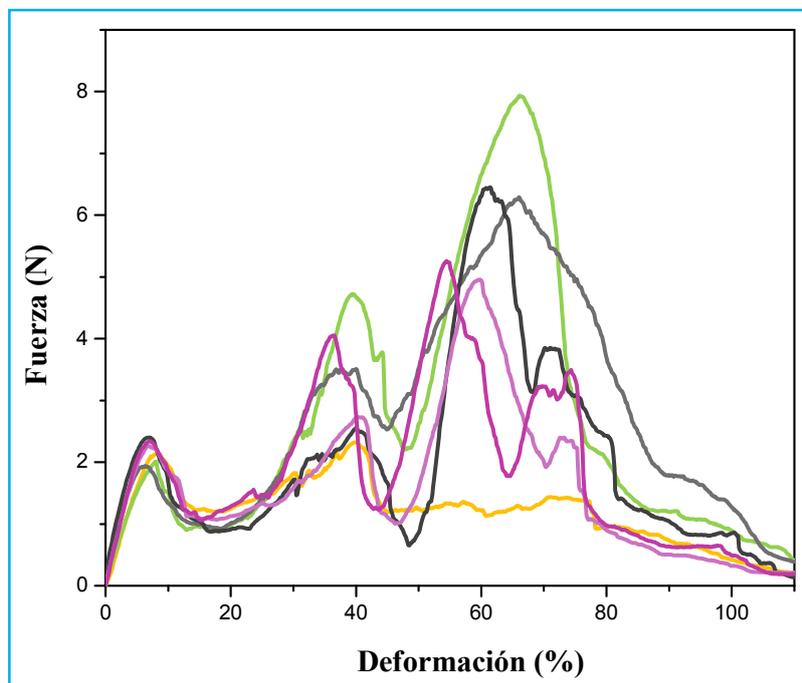


Figura 4.33. Perfiles característicos del ensayo de punción de frutillas control y tratadas a los 8 días de almacenamiento. (—) control, (—) LP 11,9 J.cm⁻², (—) 2,5 min TT, (—) 5 min TT, (—) combinación 2,5 min TT – LP 11,9 J.cm⁻², (—) combinación 5 min TT – LP 11,9 J.cm⁻².

Tabla 4.41. Parámetros mecánicos de frutillas control, expuestas a tratamiento térmico e irradiación con luz pulsada, aplicados en forma individual y combinada durante el almacenamiento a 5 ± 1 °C.

Tratamiento	Día	F _R (N)	W (mJ)	D (%)	Ed (mPa)	
Control	0	2,1 ± 0,7	2,9 ± 1,2	7,0 ± 1,6	20,8 ± 6,8	a, b
	4	2,3 ± 1,0	3,6 ± 2,0	7,5 ± 2,2	21,6 ± 6,8	a, b
	8	2,0 ± 0,9	3,1 ± 1,8	7,9 ± 1,7	23,0 ± 9,2	d
LP 11,9 J.cm ⁻²	0	2,3 ± 0,7	3,1 ± 1,4	6,9 ± 1,3	23,7 ± 5,9	a
	4	2,5 ± 0,7	3,8 ± 1,6	7,7 ± 2,1	25,6 ± 7,7	a, b, c
	8	1,9 ± 0,7	3,1 ± 1,5	7,7 ± 1,8	25,8 ± 10,2	d
2,5 min TT	0	2,2 ± 0,9	3,2 ± 1,7	7,2 ± 2,3	22,2 ± 6,7	a, b
	4	2,3 ± 0,6	3,4 ± 1,4	7,0 ± 1,7	25,3 ± 6,0	a, b, c
	8	1,8 ± 0,7	2,9 ± 1,6	7,6 ± 2,4	19,5 ± 8,3	a, b
5 min TT	0	1,8 ± 0,7	2,4 ± 1,2	6,2 ± 1,5	23,0 ± 6,4	a, b, c
	4	2,5 ± 0,7	3,6 ± 1,6	6,5 ± 1,6	29,6 ± 8,2	c
	8	2,3 ± 0,9	3,5 ± 1,8	6,8 ± 1,6	27,2 ± 9,5	c
2,5 min TT – LP 11,9 J.cm ⁻²	0	2,0 ± 0,7	2,7 ± 1,3	6,7 ± 1,8	22,0 ± 7,2	a, b
	4	2,3 ± 0,9	3,4 ± 1,8	6,9 ± 1,9	25,5 ± 6,5	a, b, c
	8	2,2 ± 0,7	3,5 ± 1,5	7,7 ± 2,3	22,7 ± 7,6	a, b, c
5 min TT – LP 11,9 J.cm ⁻²	0	1,7 ± 0,5	2,4 ± 1,1	7,0 ± 2,1	19,4 ± 7,1	b
	4	2,0 ± 0,7	2,5 ± 1,3	5,7 ± 1,6	26,6 ± 8,4	c
	8	2,4 ± 0,9	3,8 ± 1,9	7,4 ± 2,2	25,7 ± 8,9	a, b, c

Los valores representan el promedio ± desviación estándar.

Promedios seguidos de distinta letra minúscula difieren significativamente ($p < 0,05$).

Tabla 4.42. Resultados del MANOVA de las propiedades mecánicas de frutos control y sometidos a tratamiento térmico y de luz pulsada, en forma individual o combinada, y almacenados a 5 ± 1 °C.

Fuente	Estadístico	GL	F	p-valor
Día	0,12	3	24,67	<0,0001
Tratamiento	0,06	5	7,21	<0,0001
Tratamiento*Día	0,12	10	7,54	<0,0001
Error		614		

Las mayores diferencias entre tratamientos y el control se evidenciaron a partir del día 4 del almacenamiento, para el tratamiento térmico individual de 5 min y su combinación con luz pulsada, que presentaron un incremento de F_R y E_d y una disminución de D , indicando que estos frutos eran más firmes y rígidos, y menos deformables. Si bien en los posteriores días de almacenamiento la F_R tendió a disminuir y D a incrementarse levemente, las diferencias significativas respecto al control se mantuvieron hasta el día 8.

Resultados similares en cuanto al efecto del tratamiento térmico sobre la firmeza de frutillas han sido reportados por diversos autores. Tal es el caso de Caleb y col. (2016) que, mediante un tratamiento y almacenamiento similar al utilizado en esta tesis (45 °C durante 5 y 10 min, almacenadas a 4 °C), reportaron un incremento significativo de la firmeza de los frutos tratados en los primeros 3 días de almacenamiento. Los valores de F_R alcanzados en ese período fueron incluso significativamente mayores a los correspondientes al control, aunque estas diferencias fueron minimizándose luego de 6 días de almacenamiento. García y col. (1995) también reportaron un incremento en la firmeza de los frutos expuestos a diferentes tratamientos térmicos. Jing y col. (2010) encontraron una disminución significativa de la firmeza inmediatamente después de realizados los tratamientos, aunque durante el almacenamiento los frutos tratados mostraron un aumento significativo de la fuerza superando significativamente los valores correspondientes a los frutos control. El efecto positivo de los tratamientos térmicos en retardar el ablandamiento e incrementar la firmeza de frutillas ha sido atribuido, en parte, a su impacto en la composición de la pared celular y en la expresión de genes y enzimas relacionadas con la degradación de la pared celular. Vicente y col. (2005) reportaron una disminución en la solubilización de pectinas durante el almacenamiento a 20 °C de frutillas tratadas térmicamente (45 °C, 3 h). Esto fue asociado con cambios en la actividad de enzimas involucradas en el metabolismo de pectinas (reducción de la actividad de las enzimas poligalacturonasa y β -galactosidasa, y aumento de la actividad pectinmetilesterasa), que se traduciría en una reducción en la escisión de pectinas y aumento de los sitios putativos para la formación de puentes de calcio dentro de la pared celular. El tratamiento también redujo la solubilización de hemicelulosas, que fue correlacionado con una reducción de la actividad de endoglucanasas y β -xilosidasa. Dotto y col. (2011) encontraron, además, que el tratamiento térmico redujo la expresión de genes de ciertas expansinas relacionadas con los procesos de ablandamiento en frutillas.

En el caso del tratamiento con luz pulsada aplicada individualmente, de forma similar a lo observado en los resultados descriptos en la **Sección 4.2.2**, no se observaron diferencias significativas respecto al control durante el período de almacenamiento estudiado, a pesar de presentar un leve aumento de F_R y E_d al día 4.

4.3.6 Efecto del tratamiento en la microestructura de frutillas

En la **Figura 4.34** se presentan las micrografías obtenidas mediante microscopía óptica correspondientes a frutillas control, sometidas a tratamiento térmico durante 5 min, expuestas a luz pulsada ($11,9 \text{ J.cm}^{-2}$) y tratadas mediante la combinación de estos dos tratamientos al día 0 del almacenamiento.

Los frutos control sin almacenar mostraron una microestructura similar a la descrita en la **Sección 4.1.1.6.1**. Brevemente, la cutícula se observó bien definida y teñida de azul, tonalidad asociada a la cutina presente en la cutícula y en la capa cutinizada. Los polisacáridos de la capa cutinizada tomaron tonalidad púrpura con el azul de toluidina. En algunas zonas la capa cutinizada presentaba una estructura más laxa y en otras se observaba con mayor grado de tinción. Las células epidérmicas presentaron morfología rectangular a irregular, con paredes bien coloreadas y algunas células aparecieron tangencialmente compactadas (**Figura 4.34 A-B**). Hacia zonas cercanas a las células epidérmicas, se observaba una transición desde una tinción muy leve de la capa cutinizada a una tonalidad azul tenue que se intensificaba al llegar a la pared celular. Pero también se observaron zonas donde la capa cutinizada y la pared celular aparecían ambas densamente teñidas. El grosor de la pared tangencial externa (OTW) resultó mayor respecto a la pared tangencial interna (ITW) y a la pared radial (RW). Además, presentó en general una tinción más intensa que la ITW, en ambos casos de coloración púrpura. Las células subepidérmicas, de gran tamaño, mostraron una morfología irregular a cuadrangular, con citoplasma parietal y escasos espacios intercelulares. En algunas zonas los espacios intercelulares se incrementaron hacia el interior del conocarpo (**Figura 4.34 B**).

En las frutillas irradiadas con luz pulsada, al igual que en el control, algunas células epidérmicas se observaron compactadas tangencialmente (**Figura 4.34 C-D**). La membrana cuticular y las paredes celulares se observaron bien definidas pero con una tinción diferente al control, tendiendo a tonos púrpura. Otra diferencia relevante respecto al tejido de los frutos control fue la contracción de las células epidérmicas, y en algunas zonas, separación de la cutícula de las capas subyacentes (**Figura 4.34 D**).

El tejido de los frutos expuestos a tratamiento térmico durante 5 min presentó paredes celulares con tinción más tenue que en el control (**Figura 4.34 E-F**). Las células epidérmicas no mostraron mayores alteraciones en cuanto a su morfología y apariencia, no así algunas células subepidérmicas que sufrieron una ligera contracción, separándose de las células epidérmicas (**Figura 4.34 F**). Se observaron disrupciones en la pared celular de algunas células subepidérmicas (**Figura 4.34 F**).

Por último, el tejido de los frutos sometidos al tratamiento combinado (**Figura 4.34 G-H**) mostró las mayores alteraciones. En algunas zonas la tinción de las paredes celulares fue similar a la observada en el tejido sometido a tratamiento térmico (**Figura 4.34 G**) y en otras, mostraron una tinción azulada muy suave (**Figura 4.34 H**). Las células epidérmicas se observaron tangencialmente compactadas, y las subepidérmicas en algunas zonas se presentaron conservadas, y en otras, con forma muy irregular y plegadas (**Figura 4.34 G**). La ITW exhibió mayor tinción que en el fruto control. Las células del conocarpo se presentaron con paredes más angulosas y numerosos restos de membranas en el lumen celular (**Figura 4.34 G**).

En resumen, el efecto inmediato de los tratamientos fue evidente tanto cuando los factores fueron aplicados en forma individual como cuando se aplicaron en forma combinada. En este último caso, el efecto observado fue más severo.

Luego de 8 días de almacenamiento refrigerado se observaron considerables cambios estructurales en el control (**Figura 4.35 A-B**). La cutícula se observó separada de las células epidérmicas (**Figura 4.35 A**), y en algunas zonas presentó disrupciones (micrografías no mostradas).

Las células epidérmicas también se separaron de las subepidérmicas y en algunas zonas se observaron contraídas tangencialmente. Las células subepidérmicas se mostraron también compactadas, con paredes celulares menos lisas. Hubo además un evidente cambio en la tinción: la membrana cuticular y las paredes celulares tomaron una coloración púrpura, indicando posibles cambios químicos respecto al día 0. Las células del interior del conocarpo presentaron plasmólisis y se incrementaron los espacios intercelulares.

El tejido de los frutos irradiados con luz pulsada se mostró mejor conservado que el control, e incluso que al tejido tratado al día 0. Presentó paredes celulares mejor definidas y con coloración más intensa, al igual que la cutícula. Las células subepidérmicas resultaron más pequeñas que al día 0 y en algunas se observaron señales de plasmólisis (**Figura 4.35 C-D**).

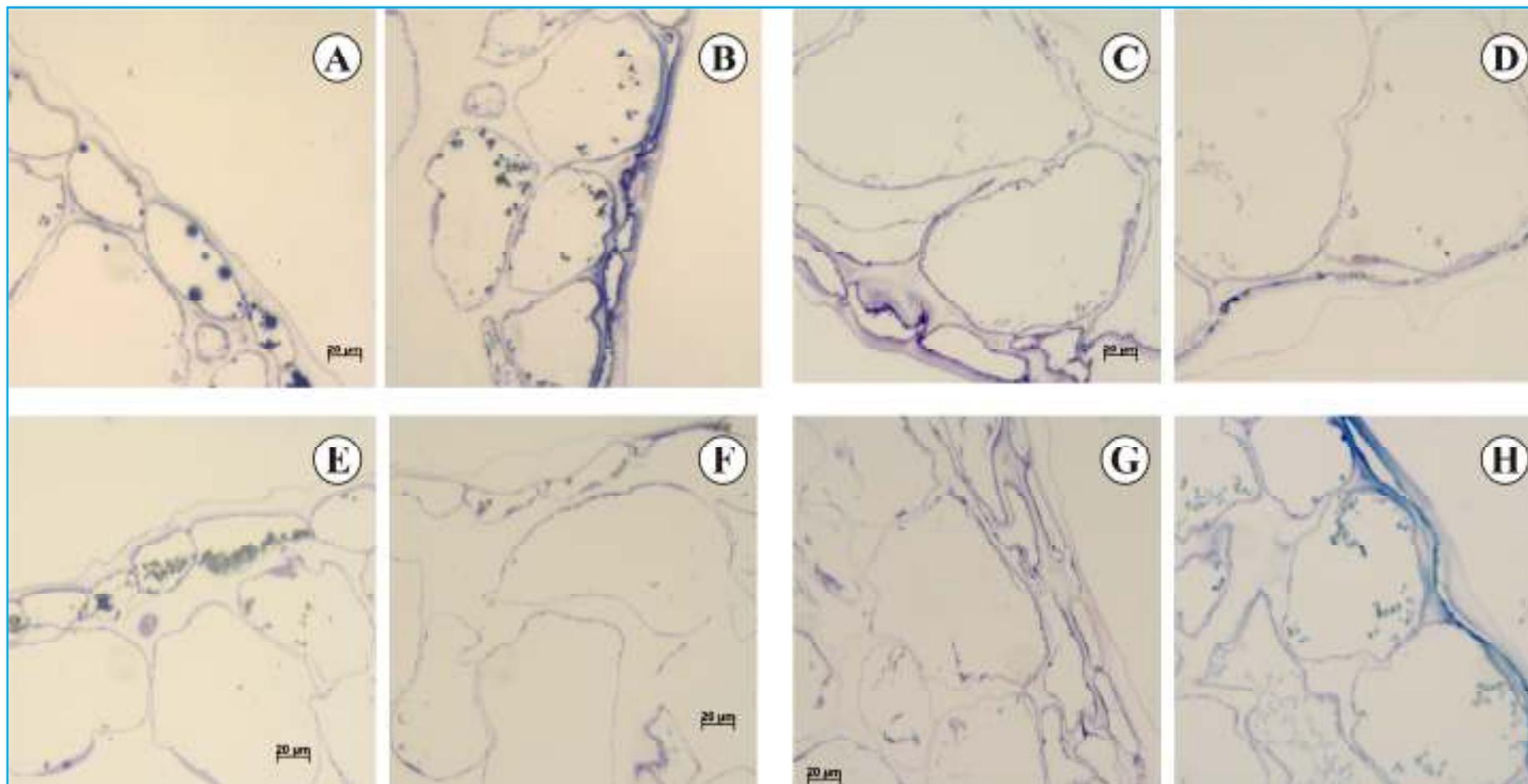


Figura 4.34. Imágenes de microscopía óptica de frutillas control y tratadas obtenidas al día 0 de almacenamiento. (A-B) control, (C-D) LP 11,9 J.cm⁻², (E-F) TT 5 min, (G-H) 5 min TT - 11,9 J.cm⁻². Escala: 20 µm.

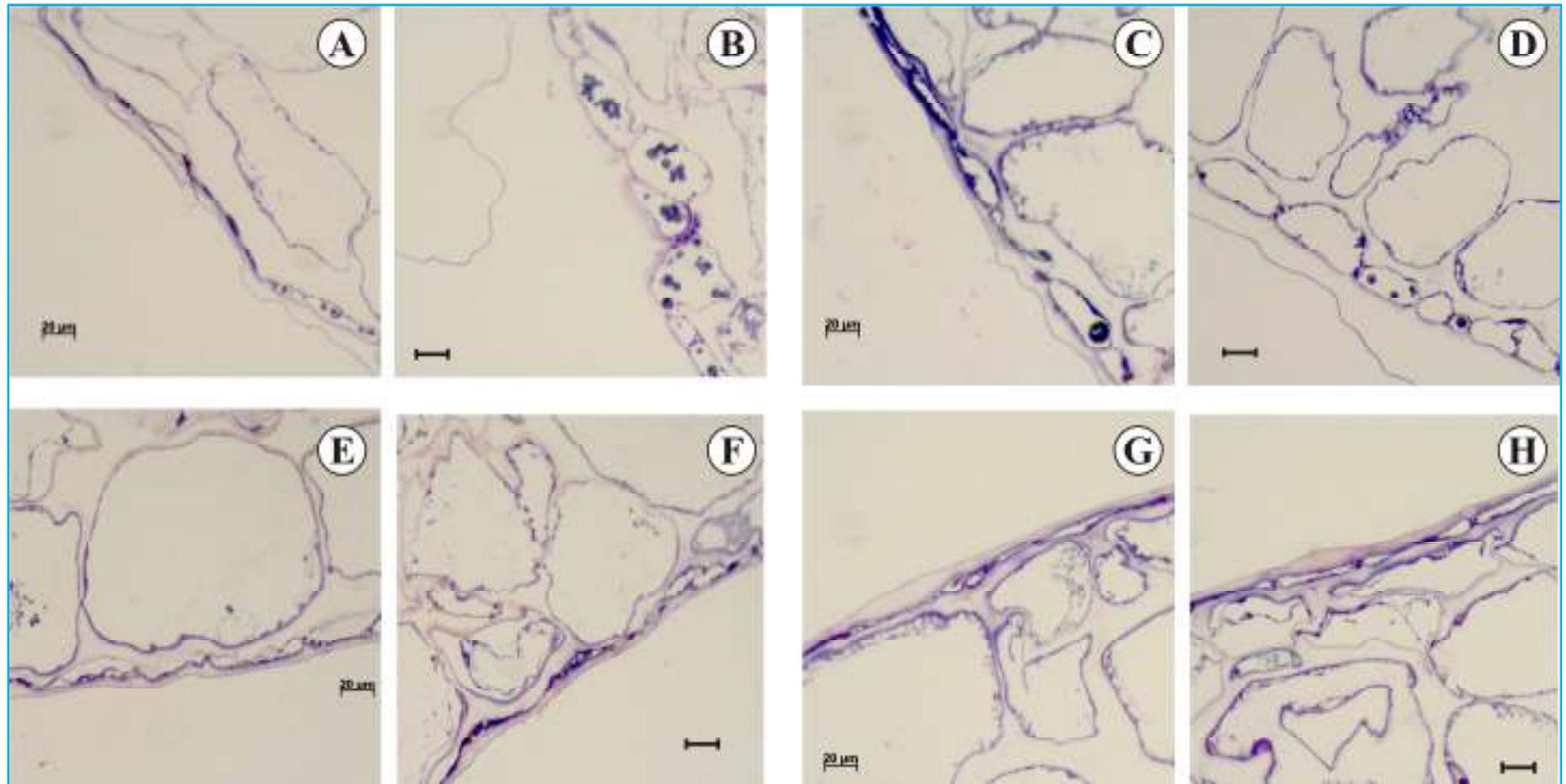


Figura 4.35. Imágenes de microscopía óptica de frutillas control y tratadas obtenidas al día 8 de almacenamiento. (A-B) control, (C-D) LP 11,9 J.cm⁻², (E-F) TT 5 min, (G-H) 5 min TT - 11,9 J.cm⁻². Escala: 20 μm.

Las micrografías correspondientes a los frutos sometidos a tratamiento térmico durante 5 min mostraron un reforzamiento de las paredes celulares (**Figura 4.35 E-F**), ya que presentaron una tinción más oscura respecto al día 0. Las células epidérmicas se observaron mayormente compactadas tangencialmente, mientras que las capas de células subyacentes presentaron un elevado grado de plasmólisis con plegamiento de las paredes, o bien exhibían ruptura de membranas y paredes más lisas. Las paredes celulares y la CM presentaron mejor tinción respecto al día 0 y al control almacenado, tomando colores púrpura tenues y en algunas zonas rosáceas. Si bien en algunas zonas se observaron interrupciones de la cutícula (**Figura 4.35 F**), mostraron un aspecto mejor conservado que el control. A pesar del reforzamiento observado en la CM y las células epidérmicas, el deterioro observado en las células del interior del conocarpo no pudo revertirse durante el almacenamiento (micrografías no mostradas).

Las células epidérmicas del tejido tratado con la combinación 5 min TT - 11,9 J.cm⁻², aparecieron completamente compactadas y con paredes celulares teñidas de color púrpura intenso (**Figura 4.35 G-H**). La OTW, muy reforzada, presentó una coloración más rosácea. La ITW se mostró más teñida que al día 0, al igual que las RW, que se visualizaron con una tinción muy densa. Al igual que en el tratamiento térmico individual, las paredes celulares presentaron una coloración intensa, y las células evidenciaron un elevado grado de plasmólisis o bien restos de membranas; las paredes aparecían con un alto grado de plegamientos (**Figura 4.35 H**).

4.3.7 Efecto de los tratamientos sobre las propiedades fisicoquímicas

En las **Tablas 4.43** y **4.44** se presentan los valores de los parámetros fisicoquímicos de los frutos, evaluados para cada tratamiento durante el almacenamiento. En la **Tabla 4.45** se presentan los resultados del ANOVA realizado sobre estos datos. En el caso de pH, °Brix y humedad la interacción entre los factores "tratamiento" y "tiempo de almacenamiento" no resultó significativa ($F_{10, 35} = 0,76$, $p = 0,664$; $F_{10, 35} = 1,14$, $p = 0,362$; $F_{10, 35} = 1,47$, $p = 0,193$, respectivamente), por lo cual los datos fueron evaluados mediante efectos principales de cada factor (**Tabla 4.45**). El ANOVA correspondiente a los datos de acidez titulable indicó que la interacción entre los factores "tratamiento" y "tiempo de almacenamiento" resultó significativa ($F_{10, 35} = 3,01$, $p = 0,007$) (**Tabla 4.45**).

Tabla 4.43. Evolución de pH, °Brix y humedad de frutos control y expuestos a tratamiento térmico e irradiados con luz pulsada, en forma individual y combinada, durante el almacenamiento a 5 ± 1 °C.

pH				
Tratamiento	Tiempo de almacenamiento (día)			
	0	4	8	
Control	$3,88 \pm 0,08$	$3,82 \pm 0,09$	$3,68 \pm 0,11$	a
LP 11,9 J.cm ⁻²	$3,96 \pm 0,07$	$3,90 \pm 0,07$	$3,76 \pm 0,05$	a, b
2,5 min TT	$3,92 \pm 0,04$	$3,89 \pm 0,04$	$3,71 \pm 0,04$	a, b
5 min TT	$3,98 \pm 0,05$	$3,84 \pm 0,03$	$3,79 \pm 0,05$	a, b
2,5 min TT – LP 11,9 J.cm ⁻²	$4,05 \pm 0,08$	$3,94 \pm 0,07$	$3,75 \pm 0,02$	b
5 min TT – LP 11,9 J.cm ⁻²	$4,00 \pm 0,05$	$3,95 \pm 0,06$	$3,83 \pm 0,09$	b
	A	B	C	

Sólidos solubles (° Brix)				
Tratamiento	Tiempo de almacenamiento (día)			
	0	4	8	
Control	$6,0 \pm 0,7$	$5,8 \pm 0,4$	$6,7 \pm 0,4$	NS
LP 11,9 J.cm ⁻²	$6,1 \pm 0,6$	$6,4 \pm 0,4$	$7,5 \pm 0,3$	NS
2,5 min TT	$6,5 \pm 0,6$	$5,6 \pm 0,5$	$7,1 \pm 0,5$	NS
5 min TT	$6,0 \pm 0,9$	$6,3 \pm 0,4$	$6,7 \pm 0,3$	NS
2,5 min TT – LP 11,9 J.cm ⁻²	$6,2 \pm 0,1$	$6,1 \pm 0,7$	$7,0 \pm 0,3$	NS
5 min TT – LP 11,9 J.cm ⁻²	$6,7 \pm 0,4$	$5,6 \pm 0,3$	$7,3 \pm 1,0$	NS
	A	A	B	

Humedad (% base húmeda)				
Tratamiento	Tiempo de almacenamiento (día)			
	0	4	8	
Control	$92,3 \pm 0,4$	$92,5 \pm 0,3$	$91,6 \pm 0,2$	NS
LP 11,9 J.cm ⁻²	$92,5 \pm 0,4$	$91,8 \pm 0,5$	$90,9 \pm 0,5$	NS
2,5 min TT	$91,7 \pm 0,6$	$92,6 \pm 0,4$	$91,0 \pm 0,2$	NS
5 min TT	$92,2 \pm 1,0$	$91,7 \pm 0,3$	$91,2 \pm 0,2$	NS
2,5 min TT – LP 11,9 J.cm ⁻²	$92,1 \pm 0,3$	$92,0 \pm 0,5$	$91,2 \pm 0,6$	NS
5 min TT – LP 11,9 J.cm ⁻²	$91,5 \pm 0,4$	$92,3 \pm 0,1$	$90,5 \pm 1,0$	NS
	A	A	B	

Los valores representan el promedio \pm desviación estándar. Los días de almacenamiento seguidos de distinta letra mayúscula difieren significativamente ($p < 0,05$). Los tratamientos seguidos de distinta letra minúscula difieren significativamente ($p < 0,05$). NS: El efecto del factor no es significativo ($p > 0,05$).

Tabla 4.44. Evolución de los valores de acidez titulable de frutos control y expuestos a tratamiento térmico e irradiación con luz pulsada, aplicados en forma individual y combinada, durante el almacenamiento a 5 ± 1 °C.

Tratamiento	Día	Acidez titulable (% ácido cítrico)	
Control	0	0,64 ± 0,03	a
	4	0,68 ± 0,03	a, b
	8	0,80 ± 0,03	a, b
LP 11,9 J.cm ⁻²	0	0,64 ± 0,03	a
	4	0,68 ± 0,03	a, b
	8	0,79 ± 0,03	a, b
2,5 min TT	0	0,75 ± 0,03	a
	4	0,65 ± 0,03	a, b
	8	0,86 ± 0,03	c
5 min TT	0	0,61 ± 0,03	a
	4	0,71 ± 0,03	a, b, c
	8	0,69 ± 0,03	a, b, c
2,5 min TT – LP 11,9 J.cm ⁻²	0	0,66 ± 0,03	a, b
	4	0,70 ± 0,03	a, b, c
	8	0,83 ± 0,03	a, c
5 min TT – LP 11,9 J.cm ⁻²	0	0,65 ± 0,03	a, b
	4	0,61 ± 0,03	a
	8	0,75 ± 0,03	a, b, c

Los valores representan el promedio ± desviación estándar.

Los promedios seguidos de distinta letra minúscula difieren significativamente ($p < 0,05$).

Tabla 4.45. Resultados del ANOVA para las propiedades fisicoquímicas.

Fuente	CM	GL	F	p-valor
<i>pH</i>				
Día	0,21	2	50,91	<0,0001
Tratamiento	0,02	5	5,24	0,001
Tratamiento*Día	0,003	10	0,76	0,664
Error	0,004	35		
R ² _{aj}	0,69			
<i>° Brix</i>				
Día	5,59	2	19,82	<0,0001
Tratamiento	0,24	5	0,85	0,521
Tratamiento*Día	0,32	10	1,14	0,362
Error	0,28	35		
R ² _{aj}	0,42			
<i>Humedad</i>				
Día	6,74	2	23,56	<0,0001
Tratamiento	0,48	5	1,67	0,169
Tratamiento*Día	6,74	10	1,47	0,193
Error	0,29	35		
R ² _{aj}	0,51			
<i>Acidez</i>				
Día	0,08	2	41,58	<0,0001
Tratamiento	0,01	5	4,19	0,004
Tratamiento*Día	0,01	10	3,01	0,007
Error	0,002	35		
R ² _{aj}	0,69			

En todas las muestras (tratadas y control) se observó una disminución significativa del pH a lo largo del almacenamiento refrigerado. Todos los tratamientos ocasionaron un leve aumento del pH, que resultó significativo sólo en los tratamientos combinados (**Tabla 4.43**). Estos cambios en el pH se correlacionaron parcialmente con los valores de la acidez titulable, que en general sufrieron un aumento durante el almacenamiento; en algunas muestras a partir del día 4 y en otras al día 8, pero sólo resultó significativo en el tratamiento térmico individual de 2,5 min. Sin embargo, en términos generales no se observaron diferencias significativas entre tratamientos a lo largo del almacenamiento (**Tabla 4.43**).

El contenido de sólidos solubles, expresado como °Brix, mostró un aumento durante el almacenamiento, que resultó significativo al día 8. Sin embargo, no hubo un efecto significativo de los tratamientos. Tampoco se observó un efecto significativo de los tratamientos en el contenido de humedad, que sufrió una disminución significativa en todas las muestras al final del almacenamiento (día 8) (**Tabla 4.43**).

Existen diversos reportes en cuanto al efecto del tratamiento térmico sobre las propiedades fisicoquímicas de distintos cultivares de frutillas. Tal es el caso de Caleb y col. (2016), que reportaron tendencias similares durante el almacenamiento a las encontradas en esta tesis para el caso de °Brix y acidez; sin embargo estos autores reportaron un incremento significativo de la acidez de las muestras tratadas a 45 °C durante 5 minutos respecto al resto de tratamientos evaluados y al control. Por otra parte, cuando el tratamiento térmico fue realizado con aire caliente, otros autores (Vicente y col., 2002; Musto y col., 2010) reportaron una disminución de la acidez titulable durante el almacenamiento.

Estos parámetros, °Brix, acidez y pH influyen en el *flavor* de los frutos y resulta evidente que las modificaciones que puedan observarse en los valores de los mismos dependen en parte, del tipo de tratamiento aplicado y el cultivar utilizado.

4.3.8 Efecto de los tratamientos sobre el contenido de compuestos bioactivos y la capacidad antioxidante

En función de los resultados obtenidos hasta aquí, para la evaluación del contenido de compuestos bioactivos y la capacidad antioxidante se seleccionaron aquellos tratamientos que representaron una mejora significativa respecto al control en la reducción del decaimiento fúngico durante el almacenamiento y en algunos de los parámetros de calidad evaluados. Se optó por el tratamiento térmico individual de 5 min y su com-

binación con luz pulsada, que fueron los dos tratamientos que más disminuyeron el nivel de infección y mostraron una mejora en las propiedades mecánicas durante el almacenamiento. Al evaluar un tratamiento combinado, fue necesario además estudiar ambos tratamientos individuales involucrados. En resumen, los tratamientos evaluados fueron: control, tratamiento individual de luz pulsada ($11,9 \text{ J.cm}^{-2}$), tratamiento térmico individual de 5 min y la combinación de éstos.

En la **Tabla 4.46** se presentan los valores obtenidos del contenido de antocianinas totales (AT), y en la **Tabla 4.47** de compuestos fenólicos totales (FT) y capacidad antioxidante (TEAC y ORAC), para frutos tratados y control durante el almacenamiento refrigerado. El análisis estadístico correspondiente a cada variable (ANOVA) se presenta en la **Tabla 4.48**. El análisis estadístico de los datos correspondientes a la evaluación de AT indicó que la interacción entre los factores "tratamiento" y "tiempo de almacenamiento" resultó significativa ($F_{6, 163} = 12,9, p < 0,0001$). Los frutos control mostraron un aumento del contenido de AT a lo largo del almacenamiento que sólo resultó significativo al día 8. Los frutos irradiados con luz pulsada mostraron un contenido de AT significativamente mayor al control inmediatamente después de realizado el tratamiento (día 0), pero las diferencias con el control se minimizaron a partir del día 4 y hasta el final del almacenamiento, resultando no significativas. El tratamiento térmico individual de 5 min mostró leves variaciones a lo largo del almacenamiento que no resultaron en diferencias significativas respecto al control en ninguno de los períodos de almacenamiento estudiados. El tratamiento combinado 5 min TT – LP $11,9 \text{ J.cm}^{-2}$ mostró un aumento significativo en el contenido de AT al día 4, pero al final del almacenamiento los niveles de AT disminuyeron significativamente, por debajo de los valores correspondientes al control almacenado.

El análisis estadístico del contenido de fenoles totales indicó que la interacción entre los factores "tratamiento" y "tiempo de almacenamiento" no resultó significativa ($F_{6, 163} = 2,0, p < 0,072$), pero sí lo fueron los efectos principales de cada factor (**Tabla 4.48**). Al igual que lo observado para el contenido de AT, todos los tratamientos causaron un leve incremento no significativo del contenido de FT al día 4 del almacenamiento, a excepción del tratamiento individual de luz pulsada que disminuyó monótonamente durante todo el almacenamiento. Al día 8, el contenido de FT disminuyó significativamente en todos los tratamientos y en el control. Se observó un efecto significativo de los tratamientos, que tendieron a reducir el contenido de FT respecto al control. Si bien se

observaron leves diferencias entre los valores de FT de los distintos tratamientos, las mismas no resultaron significativas.

El ANOVA correspondiente a los valores TEAC indicó que la interacción entre los factores "tratamiento" y "tiempo de almacenamiento" resultó no significativa ($F_{6, 108} = 1,4, p < 0,219$), pero sí lo fueron los efectos principales (**Tabla 4.46**). Se observó una disminución significativa de los valores TEAC de todas las muestras (tratadas y control) durante el almacenamiento. Por otra parte, todos los tratamientos redujeron la capacidad antioxidante de las muestras respecto al control, resultando esta disminución significativa en el caso del tratamiento individual de luz pulsada y en el tratamiento combinado, pero no así en el tratamiento térmico individual.

Tabla 4.46. Contenido de antocianinas de frutos control, expuestos a tratamiento térmico e irradiados con luz pulsada en forma individual y combinada, durante el almacenamiento a 5 ± 1 °C.

Tratamiento	Día	Antocianinas (mgPg3/100g)	
Control	0	320,9 ± 80,5	a, b
	4	363,0 ± 55,5	b, c, d
	8	424,4 ± 53,4	c, d, e
11,9 J.cm ⁻²	0	444,9 ± 76,0	d, e
	4	334,6 ± 107,4	a, b, c
	8	363,6 ± 110,6	b, c, d
5 min TT	0	364,4 ± 42,3	b, c, d
	4	393,0 ± 57,6	b, c, d, e
	8	340,3 ± 25,5	a, b, c
5 min TT - 11,9 J.cm ⁻²	0	354,1 ± 70,8	a, b, c
	4	461,6 ± 82,1	e
	8	272,8 ± 71,2	a

Los valores representan el promedio ± desviación estándar.

Promedios seguidos de distinta letra minúscula difieren significativamente ($p < 0,05$).

Tabla 4.47. Evolución del contenido de compuestos fenólicos y capacidad antioxidante (TEAC y ORAC) de frutos control, expuestos a tratamiento térmico e irradiados con luz pulsada, en forma individual y combinada, durante el almacenamiento a 5 ± 1 °C.

FT (mg AG/100 g b.s.)				
Tratamiento	Tiempo de almacenamiento (día)			
	0	4	8	
Control	3070,5 ± 304,2	3136,0 ± 627,2	2716,0 ± 202,1	a
LP 11,9 J.cm ⁻²	2871,3 ± 95,8	2770,6 ± 434,3	2345,7 ± 464,5	b
5 min TT	2791,2 ± 115,4	2837,2 ± 338,0	2442,8 ± 244,5	b
5 min TT - LP 11,9 J.cm ⁻²	2421,0 ± 222,3	2979,7 ± 308,1	2372,7 ± 208,2	b
	A	A	B	

TEAC (mmol Trolox/100 g b.s.)				
Tratamiento	Tiempo de almacenamiento (día)			
	0	4	8	
Control	70,4 ± 7,3	55,9 ± 7,0	42,1 ± 6,2	a
LP 11,9 J.cm ⁻²	68,8 ± 5,5	49,4 ± 7,9	35,9 ± 5,7	b
5 min TT	65,5 ± 3,7	51,0 ± 10,1	38,8 ± 8,3	a, b
5 min TT - LP 11,9 J.cm ⁻²	59,0 ± 3,1	42,3 ± 4,7	37,6 ± 6,6	b
	A	B	C	

ORAC (mmol Trolox/100 g b.s.)				
Tratamiento	Tiempo de almacenamiento (día)			
	0	4	8	
Control	167,0 ± 70,4	240,2 ± 20,2	219,2 ± 56,3	NS
LP 11,9 J.cm ⁻²	165,7 ± 81,8	225,9 ± 33,7	187,5 ± 35,0	NS
5 min TT	147,1 ± 64,2	238,1 ± 38,8	201,8 ± 54,6	NS
5 min TT - LP 11,9 J.cm ⁻²	134,1 ± 52,8	224,8 ± 35,4	197,0 ± 52,9	NS
	A	B	B	

Los valores representan el promedio ± desviación estándar. NS: El efecto del factor no es significativo ($p > 0,05$).

Los días de almacenamiento seguidos de distinta letra mayúscula difieren significativamente ($p < 0,05$).

Los tratamientos seguidos de distinta letra minúscula difieren significativamente ($p < 0,05$).

Tabla 4.48. Resultados del ANOVA para las determinaciones de contenido de antocianinas totales, compuestos fenólicos totales y capacidad antioxidante (TEAC y ORAC).

Fuente	CM	GL	F	p-valor
<i>Antocianinas totales</i>				
Día	20406,4	2	3,72	0,026
Tratamiento	2834,7	3	0,52	0,672
Tratamiento*Día	70813,7	6	12,9	<0,0001
Error	5491,3	163		
R ² _{aj}	0,3			
<i>Fenoles totales</i>				
Día	2234746,7	2	20,39	<0,0001
Tratamiento	850231,3	3	7,76	0,0001
Tratamiento*Día	219130,9	6	2,0	0,072
Error	109612,6	108		
R ² _{aj}	0,35			
<i>TEAC</i>				
Día	7521,1	2	171,91	<0,0001
Tratamiento	391,8	3	8,9	<0,0001
Tratamiento*Día	61,5	6	1,4	0,219
Error	43,7	108		
R ² _{aj}	0,76			
<i>ORAC</i>				
Día	31484,9	2	11,44	0,0001
Tratamiento	1435,3	3	0,52	0,670
Tratamiento*Día	506,7	6	0,18	0,980
Error	2752,3	48		
R ² _{aj}	0,2			

Por el contrario, el ANOVA correspondiente a los valores ORAC indicó, por un lado, que la interacción entre factores no fue significativa ($F_{6, 48} = 0,18$, $p < 0,98$), y que sólo el efecto principal del "tiempo de almacenamiento" fue significativo (**Tabla 4.48**). Es decir, los tratamientos no tuvieron un efecto significativo en la capacidad antioxidante de las muestras determinados mediante esta técnica. Por otro lado, el almacenamiento refrigerado provocó un aumento en los valores ORAC tanto de los frutos control como tratados a lo largo del almacenamiento estudiado.

En la **Tabla 4.49** se presentan los resultados del análisis de correlación entre el contenido de compuestos bioactivos y la capacidad antioxidante de las muestras. Como se mencionó anteriormente, la acumulación de antocianinas y compuestos fenólicos mantuvo la misma tendencia durante el almacenamiento, y esto se tradujo en una correlación leve pero significativa ($r = 0,46$; $p = 0,0003$) entre ambas variables. Se observaron además, correlaciones significativas entre AT y ORAC ($r = 0,31$; $p = 0,0148$), FT y ORAC ($r = 0,30$; $p = 0,0216$), y FT y TEAC ($r = 0,62$; $p < 0,0001$). Si bien los compuestos fenólicos, incluyendo las antocianinas, son compuestos abundantes que contribuyen a la capacidad antioxidante de las frutillas, aún cuando la correlación con TEAC y ORAC fue significativa, los coeficientes de correlación fueron considerablemente débiles.

Tabla 4.49. Resultado del análisis de correlación de Pearson para el contenido de antocianinas, compuestos fenólicos y capacidad antioxidante de frutos control, expuestos a tratamiento térmico e irradiados con luz pulsada, en forma individual y combinada, durante el almacenamiento a 5 ± 1 °C.

	AT	FT	TEAC	ORAC
AT	1,00	0,0003	0,1478	0,0148
FT	0,46	1,00	<0,0001	0,0216
TEAC	0,19	0,62	1,00	0,5016
ORAC	0,31	0,30	-0,09	1,00

En estudios previos realizados por el grupo de trabajo (Escobar Tobar, 2017), se encontró que la irradiación con luz pulsada de frutillas cv. Camarosa ocasionó una disminución en el contenido de antocianinas totales a partir del día 0 y hasta el día 8 de almacenamiento. En el caso de este estudio se observó un comportamiento diferente al

día 0, pero luego, ambos cultivares mantuvieron la misma tendencia, con valores de AT que si bien resultaron menores al control, las diferencias no fueron estadísticamente significativas. De igual manera, Escobar-Tobar (2017) reportó una disminución del contenido de FT en los frutos irradiados con luz pulsada durante el almacenamiento que no resultó significativamente menor al control. En este caso, el efecto del tratamiento con luz pulsada en frutillas cv. Albion fue significativo. En ambos cultivares, Albion y Camarosa, el tratamiento no tuvo un efecto significativo en los valores ORAC, a pesar de las diferencias observadas en el contenido de AT y FT.

En cuanto al tratamiento térmico, existen diversos reportes que, contrariamente a lo observado en esta tesis, indican una reducción en el contenido de AT inmediatamente después de exponer los frutos a altas temperaturas (Vicente y col., 2002) y hasta los primeros 3 días de almacenamiento a 4 ± 1 °C (Caleb y col., 2016). Ambos autores reportaron además, un incremento en el contenido de AT durante el almacenamiento. Esta disminución inmediata en el contenido de AT fue adjudicada a una reducción en la actividad de la enzima fenilalanina amonio-liasa debido a la interrupción de la síntesis normal de proteínas como consecuencia del tratamiento térmico. Una posterior recuperación de la actividad de esta enzima explicaría el incremento en el contenido de AT durante el almacenamiento.

En el caso de la acumulación de compuestos fenólicos, los resultados aquí obtenidos muestran un comportamiento similar al de antocianinas, en contradicción con los reportados por Musto y col. (2010), que observaron un incremento en el contenido de FT en los frutos sometidos a tratamiento térmico. Estas diferencias podrían atribuirse a los distintos cultivares utilizados y al tipo de tratamiento (aire o inmersión en agua caliente).

Los resultados obtenidos en la evaluación de la capacidad antioxidante concuerdan con aquellos publicados por Caleb y col. (2016) en frutillas cv. Sonata, sometidas a un tratamiento térmico similar al utilizado en esta tesis (45 °C durante 5 min), que mostraron una disminución de la capacidad antioxidante que resultó significativa después de 9 días de almacenamiento a 4 ± 1 °C. Si bien las variaciones de los valores TEAC fueron leves, resultaron significativos respecto al control, mientras que los valores ORAC no fueron afectados significativamente por los distintos tratamientos, ya sea individuales o combinados.

4.3.9 Integración de los resultados de la Sección 4.3

Como ha sido mencionado anteriormente, la efectividad antimicrobiana del tratamiento con luz pulsada y del tratamiento térmico no sólo dependería del efecto *per se* sobre los microorganismos presentes en el fruto, sino también de la respuesta de defensa generada en éste al ser sometido al/los factor/es de estrés.

En comparación a la aplicación de luz pulsada, existen muchos más estudios sobre la aplicación de tratamiento térmico para extender la vida útil de frutillas, en donde se han estudiado en mayor profundidad los cambios asociados con la inducción de la respuesta de defensa, principalmente a nivel de la expresión de genes y la actividad de enzimas relacionadas con el metabolismo de la pared celular, y la acumulación de compuestos con propiedades antimicrobianas y propiedades antioxidantes. Por otra parte, los reportes existentes del estudio de la aplicación de estas técnicas en combinación son más escasos.

En lo que respecta a los resultados analizados en esta sección, los tratamientos combinados de luz pulsada y tratamiento térmico no resultaron en un mayor retardo y reducción del nivel de infección de la micoflora nativa de frutillas respecto a los tratamientos térmicos aplicados individualmente. De estos últimos, el que mejor desempeño mostró fue el tratamiento de 5 min. Este tratamiento también, al ser aplicado individualmente o en combinación, causó mejoras en la firmeza y rigidez de los frutos durante el almacenamiento refrigerado (más evidentes al día 4), caracterizadas principalmente por mayores valores de F_R y E_d , y menores valores de D . Estas diferencias pudieron correlacionarse con las observaciones microscópicas. El notable refuerzo de las paredes tangenciales externa e interna de las células epidérmicas y de las paredes celulares de las células subepidérmicas, explicarían las mejoras observadas en los parámetros mecánicos analizados. Del mismo modo, este reforzamiento de las paredes celulares respaldaría, en parte, la mayor reducción observada en el desarrollo de la microbiota nativa en comparación al control. Por otro lado, el mayor grado de plasmólisis y ruptura de membranas observadas en el tejido de los frutos sometidos al tratamiento combinado, se correlacionarían con la mayor pérdida de peso evidenciada para tiempos prolongados del almacenamiento respecto a los tratamientos individuales y al control. La velocidad de transferencia del agua desde el interior de la célula hacia la pared celular y los espacios intercelulares sería mayor por la ruptura de membranas y habría mayor cantidad de agua en el apoplasto.

Si bien los cambios observados en los parámetros mecánicos y en la microestructura de los frutos sometidos al tratamiento térmico de 5 min (aplicado individualmente o en combinación con LP) evidenciarían la inducción de una respuesta de defensa, esto no se tradujo en un aumento de las propiedades antioxidantes. Por otra parte, este tratamiento produjo cambios significativos en el color, un atributo de calidad importante que define la aceptabilidad por parte del consumidor.

Finalmente, para poder definir si el tratamiento térmico de 5 min sería el más conveniente, se debería contemplar la realización de estudios sensoriales, a fines de definir si los cambios en el color determinados instrumentalmente afectarían la aceptabilidad del consumidor. Estos estudios no pudieron completarse en el transcurso de esta tesis.

5 CONCLUSIONES

- El efecto de los tratamientos con ozono en fase acuosa aplicados individualmente (máxima concentración de ozono: $3,5 \text{ mg.L}^{-1}$; 5-15 min) sobre la micoflora nativa y *Botrytis cinerea* inoculada en frutillas cv. Albion resultó dependiente de la dosis, obteniéndose una mayor inhibición con la menor dosis ensayada (5 min de exposición). Esta dosis permitió, además, reducir la pérdida de peso de los frutos durante los primeros 8 días de almacenamiento bajo refrigeración, sin ocasionar un detrimento significativo en las propiedades mecánicas, ópticas, fisicoquímicas, antioxidantes y sensoriales. A nivel estructural se evidenciaron células epidérmicas con cutículas más gruesas y electrónicamente más densas, lo que explicaría en parte la mayor reducción del desarrollo fúngico y de pérdida de peso.
- La efectividad de los tratamientos con luz pulsada (dosis: 11,9 y 22,9 J.cm^{-2}) en inhibir el desarrollo de la micoflora nativa de frutillas también dependió de la dosis aplicada, obteniéndose una reducción significativa en relación al control sólo para la dosis de LP de 22,9 J.cm^{-2} . Contrariamente, en los estudios desarrollados con frutos inoculados con *B. cinerea*, la reducción en el nivel de infección resultó independiente de la dosis de LP aplicada.
- De las combinaciones de ozono en fase acuosa y luz pulsada evaluadas, la aplicación de ozono durante 5 min y posterior irradiación con luz pulsada con una dosis de 11,9 J.cm^{-2} resultó el tratamiento más efectivo para reducir el desarrollo de la microbiota nativa durante períodos cortos de almacenamiento, sin modificar en forma significativa los parámetros mecánicos evaluados.
- La combinación de tratamientos térmicos moderados durante 2,5 y 5 min con una dosis de luz pulsada de 11,9 J.cm^{-2} no resultaron en una disminución significativa del desarrollo de la micoflora nativa respecto a los tratamientos térmicos individuales. El tratamiento térmico de 5 min resultó el más efectivo para reducir el desarrollo fúngico durante el almacenamiento, sin afectar significativamente el contenido de antocianinas, la capacidad antioxidante y los parámetros fisicoquímicos de los frutos. Este tratamiento ocasionó, además, una mejora en la firmeza y rigidez de los frutos a lo largo del almacenamiento, que pudo ser correlacionado con un refuerzo de las paredes tangenciales externa e interna de las células epi-

dérmicas y las paredes celulares de las células subepidérmicas. Sin embargo, este tratamiento alteró de forma significativa las propiedades ópticas.

■ Si bien los tratamientos combinados evaluados redujeron significativamente el nivel de infección, no lograron superar los resultados obtenidos con los tratamientos individuales más efectivos. Por lo tanto, para alcanzar una mayor vida útil es preciso profundizar el conocimiento de estas tecnologías, a fines de encontrar las dosis y tiempos de exposición óptimos para ser aplicados en forma combinada entre sí y/o con otros factores de estrés.

■ Como conclusiones generales de la aplicación de estas técnicas de preservación, podemos mencionar que los mayores efectos de los tratamientos en la inhibición de la micoflora característica de frutillas se encontraron para días intermedios del almacenamiento, y no para tiempos de almacenamiento prolongados. La inducción de una respuesta de defensa en los frutos tendría un rol importante en esta inhibición y en los cambios en las propiedades mecánicas. Además, tanto la efectividad antimicrobiana como el impacto en los parámetros de calidad dependerían de la dosis aplicada, el cultivar, las condiciones del lote al momento de cosecha, y las condiciones posteriores de almacenamiento. Cabe destacar que dada la gran variabilidad entre frutos de un mismo lote y entre lotes, y que los efectos de los tratamientos sobre los distintos parámetros de calidad evaluados no fueron pronunciados, sólo se pudieron establecer tendencias durante el almacenamiento, dificultando la diferenciación entre tratamientos.

6 BIBLIOGRAFÍA

Aaby K., Skrede G., & Wrolstad R.E. (2005). Phenolic composition and antioxidant activities in flesh and achenes of strawberries (*Fragaria ananassa*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 4032-4040.

Aaby K., Ekeberg D., & Skrede G. (2007). Characterization of phenolic compounds in strawberry (*Fragaria x ananassa*) fruits by different HPLC detectors and contribution of individual compounds to total antioxidant capacity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55, 4395-4406.

Abbott J.A., Lu R., Upchurch B.L., & Stroshine R.L. (1997). Technologies for non-destructive quality evaluation of fruits and vegetables. *Horticultural Review*, 20, 1-12.

Abbott J. A. (2004). Textural quality assessment for fresh fruits and vegetables. *Quality of Fresh and Processed Foods*, 542, 265-279.

Aday M.S., Büyükcan M.B., Temizkan R., & Caner C. (2014). Role of ozone concentrations and exposure times in extending shelf life of strawberry. *Ozone: Science and Engineering*, 36(1), 43–56.

Aguilera J.M., & Stanley D.W. (1999). Microstructural principles of food processing and engineering, segunda ed. Editorial Aspen, Gaithersburg.

Alexandre E.M.C., Santos-Pedro D.M., Brandão T.R.S., & Silva C.L.M. (2011). Influence of aqueous ozone, blanching and combined treatments on microbial load of red bell peppers, strawberries and watercress. *Journal of Food Engineering*, 105(2), 277–82.

Alexandre E.M.C., Brandão T.R.S., & Silva C.L.M. (2012). Efficacy of non-thermal technologies and sanitizer solutions on microbial load reduction and quality retention of strawberries. *Journal of Food Engineering*, 108, 417–26.

Allende A., Marín A., Buendía B., Tomás-Barberán F., & Gil, M.I. (2007). Impact of combined postharvest treatments (UC-C light, gaseous O₃, superatmospheric O₂ and high CO₂) on health promoting compounds and shelf-life of strawberries. *Postharvest Biology and Technology*, 46, 201-211.

Alzamora S.M., Cerrutti P., Guerrero, S., & López-Malo A. (1995). Minimally processed fruits by combined methods En: Welti-Chanes J. y Barbosa-Cánovas G.V. (Eds), *Food Preservation by Moisture control: Fundamentals and Applications*, ISOPOW Practicum II. Technomic Pub. Co, Estados Unidos. Pág. 463-493.

Alzamora S.M., López-Malo A. & Tapia M.S. (2000). Overview. En: Alzamora S.M., Tapia M.S. & López-Malo A. (eds), *Minimally Processed Fruits and Vegetables*, Maryland Aspen Publishers Inc. Pág. 1-9.

Alzamora S.M., Guerrero S., Nieto A.B., & Vidales S. (2004). Conservación de frutas y hortalizas mediante tecnologías combinadas. Manual de Capacitación. Revisado y referido por Danilo Mejía (AGST officer). Publishing and Multimedia Service, Information Division, Food and Agricultural Organization of the United Nations (FAO de N.U.), Roma, Italia.

Alzamora S.M., Guerrero S., López-Malo A., Welti-Chanes J., Palou E., & Argaiz A. (2005). En: Jongen W. (Ed.), *Improving the Safety of Fresh Fruits and Vegetables, Combined preservation techniques for fresh fruits*, WoodHead Publishing Limited Cambridge, Inglaterra y CRC Press LLC, Florida, Estados Unidos. Pág. 599-630.

Alzamora S.M., Viollaz P.E., Martínez V.Y., Nieto A.B., Salvatori D.M. (2008). Exploring the linear viscoelastic properties structure relationship in processed fruit tissues. En: Gutiérrez-López G.E., Barbosa-Cánovas G.V., Welti-Chanes J. & Parada-Arias E. (Eds.), *Food engineering: Integrated approaches*, Springer, Nueva York. Pág. 133-214.

Alzamora S.M., López-Malo A., Tapia M.S., & Guerrero S.N. (2015). The hurdle concept in fruit processing. En: Rosenthal A., Deliza R., Barbosa-Cánovas G.V. & Welti-Chanes J. (Eds.), *Fruit Preservation: Novel and Conventional Technologies*, Springer-Verlag, Nueva York. Pág. 93-126.

Anderson J.G., Rowan N.J., MacGregor S.J., Fouracre R.A. & Farish O. (2000). Inactivation of food-bourne enteropathogenic bacteria and spoilage fungi using pulsed-light. *IEEE transactions on Plasma Science*, 28, 83-88.

Ayala-Zavala J.F., Shiow Y.W., Chien Y.W., & González-Aguilar GA. (2004). Effect of storage temperatures on antioxidant capacity and aroma compounds in strawberry fruit. *LWT - Food Science and Technology*, 37(7), 687-95.

Bader H. & Hoigné J. (1982). Determination of ozone in water by the indigo method: a submitted standard method. *Ozone: Science and Engineering*, 4, 169-176.

Badui S. (2006). Química de los alimentos. Ed. Alhambra Mexicana.

Baka M. Mercier J., Corcuff R. Castaigne F. & Arul J. (1999). Photochemical treatment to improve storability of fresh strawberries. *Journal of Food Science*, 64(6), 1068-1072.

Barkai-Golan R. (2001). Soft fruits and berries En: Barkai-Golan R. (ed.), *Post-harvest diseases of fruits and vegetables. Development and control*, Elsevier, Amsterdam. Pág. 310-320.

Bartley I.M., & Knee M. (1982). The chemistry of textural changes in fruit during storage. *Food Chemistry*, 9(1-2), 47-58.

Bataller-Venta M., Santa Cruz-Broche S., & García-Pérez M. (2010). El ozono: una alternativa sustentable en el tratamiento poscosecha de frutas y hortalizas. *Revista CENIC Ciencias Biológicas*, 41, 155-164.

Bhat R., & Stamminger R. (2015). Preserving strawberry quality by employing novel food preservation and processing techniques-recent updates and future scope- An overview. *Journal of Food Process Engineering*, 38, 536-554.

Bialka K.L., & Demirci A. (2007). Efficacy of aqueous ozone for the decontamination of *Escherichia Coli* O157:H7 and *Salmonella* on raspberries and strawberries. *Journal of Food Protection*, 70(5), 1088–1092.

Birmp A., Sfika V., & Vantarakis A. (2013). Ultraviolet light and ultrasound as non-thermal treatments for the inactivation of microorganisms in fresh ready-to-eat foods. *International Journal of Food Microbiology*, 167, 96-102.

Blanco C., de los Santos B., & Romero F. (2006). Relationship between concentrations of *Botrytis cinerea* conidia in air, environmental conditions, and the incidence of grey mould in strawberry flowers and fruits. *European Journal of Plant Pathology*, 114, 415-425.

Caleb O.J., Wegner G., Rolleczeck C., Herppich W.B., Geyer M., & Mahajan P.V. (2016). Hot water dipping: impact on postharvest quality, individual sugars, and bioactive compounds during storage of ‘Sonata’ strawberry. *Scientia Horticulturae*, 210, 150-157.

Camps C., Guillermin P., Mauget J.C., & Bertrand D. (2005). Data analysis of penetrometric force/displacement curves for the characterization of whole apple fruits. *Journal of Texture Studies*, 36, 387-401.

Canuto G.A.B., Oliveira D.R., da Conceição L.S.M., Farah J.P.S., & Tavares M.F.M. (2016). Development and validation of a liquid chromatograph method for anthocyanins in strawberry (*Fragaria spp.*) and complementary studies on stability, kinetics and antioxidant power. *Food Chemistry*, 192, 566-574.

Carpita N.C., & Gibeaut D.M. (1993). Structural models of primary cell walls in flowering plants: consistency of molecular structure with the physical properties of the walls during growth. *The Plant Journal*, 3(1), 1-30.

Cerezo A.B., Cuevas E., Winterhalter P., Garcia-Parrilla M.C., & Troncoso A.M. (2010). Isolation, identification, and antioxidant activity of anthocyanin compounds in Camarosa strawberry. *Food Chemistry*, 123, 574-582.

Chaïb J., Devaux M.F., Grotte M.G., Robini K., Causse M., Lahaye M., & Marty I. (2007). Physiological relationships among physical, sensory, and morphological attributes of texture in tomato fruits. *Journal of Experimental Botany*, 58 (8), 1915–1925.

Civello P.M., Martínez G.A., Chaves A.R., & Añón M.C. (1997). Heat treatments delay ripening and postharvest decay of strawberry fruit. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45 (12), 4589-4594.

Cordenunsi B.R., Nascimento J.R.O., & Lajolo F.M. (2003). “Physico-chemical changes related to quality of five strawberry fruit cultivars during cold storage.” *Food Chemistry*, 83(2), 167–73.

Cordenunsi B.R., Genovese M.I., Nascimento J.R.O., Hassimotto N.M.A., Dos Santos R.J., & Lajolo F.M. (2005). Effects of temperature on the chemical composition and antioxidant activity of three strawberry cultivars. *Food Chemistry*, 91(1), 113–21.

Cullen P.J., Tiwari B.K., O’Donnell C.P., & Muthukumarappan K. (2009). Modelling approaches to ozone processing of liquid foods. *Trends in Food Science and Technology*, 20, 125–36.

Cullen P.J., Valdramidis V.P., Tiwari B.K., Patil S., Bourke P., & O’Donnell, C.P. (2010). Ozone processing for food preservation: an overview on fruit juice treatments. *Journal of the International Ozone Association*, 32, 166-179.

Dávalos A., Gómez-Cordovés C., & Bartolomé B. (2004). Extending applicability of the oxygen radical absorbance capacity (ORAC–Fluorescein) assay. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(1), 48-54.

de Souza V.R., Pereira P.A.P., da Silva T.L.T., de Oliveira Lima L.C., Pio R., & Queiroz F. (2014). Determination of the bioactive compounds, antioxidant activity and chemical composition of Brazilian blackberry, red raspberry, strawberry, blueberry and sweet cherry fruits. *Food Chemistry*, 156, 362-368.

de Souza Ferreira W.F., Rodrigues de Alencar E., Alves H., Lamounier Riveiro J., & da Silva C.R. (2017). Influence of pH on the efficacy of ozonized water to control microorganisms and its effect on the quality of stored strawberries (*Fragaria x ananassa* Duch.). *Ciência e Agrotecnologia*, 41, 692-700.

Delgado F., Jiménez A., & Paredes O. (2000). Natural pigments: carotenoids, anthocyanins and betalains, characteristics, biosynthesis, processing, and stability. *Food Science and Nutrition*, 40, 173-289.

Desmet M., Lammertyn J., Verlinden B.E. & Nicolai B.M. (2002). Mechanical properties of tomatoes as related to puncture injury susceptibility. *Journal of Texture Studies*, 33, 415-429.

Dotto M.C., Pombo M.A., Martínez G.A., & Civello P.M. (2011). Heat treatment and expansin gene expression in strawberry fruit. *Scientia Horticulturae*, 130, 775-780.

Droby S., & Lichter A. (2007). Post-harvest *Botrytis* infection: etiology, development and management. En: Elad Y., Williamson B., Tudzynski P. & Delen N.N. (Eds), *Botrytis: Biology, Pathology and Control*. Kluwer Academic Publishers, Springer, Dordrecht, Netherlands. Pág. 349-367.

Duarte-Molina F., Gómez P.L., Castro M.A., & Alzamora S. M. (2016). Storage quality of strawberry fruit treated by pulsed light: fungal decay, water loss and mechanical properties. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 34, 267-274.

Duckworth R.B. (1996). Structure. En: Duckworth, R.B. (Ed.), *Fruit and Vegetables*, Pergamon Press, Oxford. Pág. 38-62.

Escobar-Tobar A. (2017). Impacto de la aplicación de luz pulsada de alta intensidad sobre compuestos bioactivos y capacidad antioxidante de frutilla. Tesis de maestría, Universidad de Buenos Aires.

Fallik E., Tuvia-Alkalai S., Feng X., & Lurie S. (2001). Ripening characterization and decay development of stored apples after a short pre-storage hot water rinsing and brushing. *Innovative Food Science and Emerging Technology*, 2, 127-132.

Farrell H., Garvey M., & Rowan N. (2009). Studies on the inactivation of medically important *Candida* species on agar surfaces using pulsed light. *Federation of European Microbiological Societies*, 9, 956-966.

Ferrario M., Alzamora S.M., & Guerrero S. (2014). Study of pulsed light-induced damage on *Saccharomyces cerevisiae* in apple juice by flow cytometry and transmission electron microscopy. *Food and Bioprocess Technology*, 7, 1001-1011.

Fine F., & Gervais P. (2004). Efficiency of pulsed UV light for microbial decontamination of food powders. *Journal of Food Protection*, 67, 787-792.

Fischer R.L., & Bennett A.B. (1991). Role of cell wall hydrolases in fruit ripening. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 42(1), 675-703.

Folin O., & Denis W. (1915). A colorimetric method for the determination of phenol (and derivatives) in urine. *Journal of Biological Chemistry*, 22, 305-308.

Fuleki T., & Francis F. J. (1968a). Quantitative methods for anthocyanins. Extraction and determination of total anthocyanin in cranberries. *Journal of Food Science*, 33, 72-77.

Fuleki T., & Francis F. J. (1968b). Quantitative methods for anthocyanins. Determination of total anthocyanin and degradation index for cranberry juice. *Journal of Food Science*, 33, 78-83.

García J.M., Aquilera C., & Albi M.A. (1995). Postharvest heat treatment on Spanish strawberry (*Fragaria x ananassa* cv. Tudla). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 43, 1489-1492.

Gasparri M., Giampieri F., Forbes-Hernandez T.Y., Afrin S., Cianciosi D., Reboredo-Rodriguez P., Varela-Lopez A., Zhang J.J., Quiles J.L., Mezzetti B., Bompadre S., & Battino, M. (2018). Strawberry extracts efficiently counteract inflammatory stress induced by the endotoxin lipopolysaccharide in human dermal fibroblast. *Food and Chemical Toxicology*, 114, 128-140.

Gechev T.S., Van Breusegem F., Stone J.M., Denev I., & Laloi C. (2006). Reactive oxygen species as signals that modulate plant stress responses and programmed cell death. *Bio Essays*, 28, 1-11.

Giampieri F., Tulipani S., Alvarez-Suarez J., Quiles J., Mezzetti B., & Battino M. (2012). The strawberry: composition, nutritional quality, and impact on human health. *Nutrition*, 28, 9-19.

Giovannoni, J. (2001). Molecular biology of fruit maturation and ripening. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 52, 725-749.

Giusti M.M., Rodriguez-Saona L.E., & Wrolstad R.E. (1999). Molar absorptivity and color characteristics of acylated and non-acylated pelargonidin-based anthocyanins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47, 4631-4637.

Giusti M.M., & Wrolstad R.E. (2001). Anthocyanins characterization and measurement with UV-Visible spectroscopy. En: Wrolstad, R.E. (Ed.), *Current Protocols in Food Analytical Chemistry*, John Wiley & Sons, New York, Estados Unidos.

Gómez-López V.M., Devlieghere F., Bonduelle V., & Debevere J. (2005). Factor affecting the inactivation of microorganisms by intense light pulses. *Journal of Applied Microbiology*, 99, 460-470.

Gómez-López V.M., Ragaert P., Debevere J., & Devlieghere F. (2007). Pulsed light for food decontamination: a review. *Trends in Food Science & Technology*, 18, 464-473.

Gómez P.L., García-Loredo A., Nieto A., Salvatori D.M., Guerrero S., Alzamora S.M. (2012). Effect of pulsed light combined with an antibrowning pretreatment on quality of fresh cut apple. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 16, 102-112.

Goulao L.F., & Oliveira C.M. (2008). Cell wall modifications during fruit ripening: when a fruit is not the fruit. *Trends in Food Science & Technology*, 19, 4-25.

Halliwell B., & Gutteridge J. (1995). The definition and measurement of antioxidants in biological systems. *Free Radical Biology & Medicine*. 18, 125–126.

Harker F.R., Redgwell I.C., Hallet S.H., Murray G., & Carter G. (1997). Texture of fresh fruit. *Horticultural Reviews*, 86 (1), 35-44.

Herrera M.C., & Luque de Castro M.D. (2004). Ultrasound-assist extraction for the analysis of phenolic compounds in strawberries. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 379, 1106-1112.

Hong S., Lee H., & Kim D. (2007). Effect of hot water treatment on the storage stability of Satsuma mandarin as a postharvest decay control. *Postharvest Biology and Technology*, 43, 271-279.

Hoornstra E., De Jong G., & Notermans S. (2002). Preservation of vegetables by light. En: Society for Applied Microbiology (Ed.), *Frontiers in microbial fermentation and preservation*, Wageningen, The Netherlands. Pág. 75-77.

Huang D., Ou B., Hampsch-Woodill M., Flanagan J.A., & Prior R.L. (2002). High-throughput assay of oxygen radical absorbance capacity (ORAC) using a multi-channel liquid handling system coupled with a microplate fluorescence reader in 96-well format. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 4437-4444.

Huang D., Ou B., & Prior R.L. (2005). The chemistry behind antioxidant capacity assays. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 53(6), 1841–1856.

Jackman R., & Stanley D. (1995). Perspectives in the textural evaluation of plant foods. *Trends in Food Science and Technology*, 6, 187-194.

Järvinen R., Kaimainen M., & Kallio H. (2010). Cutin composition of selected northern berries and seeds. *Food Chemistry*, 122, 137-144.

Jeffree C.E., Baker E.A., & Holloway P.J. (1976). Origins of the fine structure of plant epicuticular membranes. En: Dickinson C.H., & Preece T.F. (Eds). *Microbiology of Aerial Plant Surfaces*, Academic Press, Londrés. Pág 119-158.

Jemni M., Gómez P.A., Souza M., Chaira N., Ferchichi A., Otón M., & Artés F. (2014). Combined effect of UV-C, ozone and electrolyzed water for keeping overall quality of date palm. *LWT - Food Science and Technology*, 59, 649-655.

Jing W., Tu K., Shao X.F., Su Z.P., Zhao Y., Wang S., & Tang J. (2010). Effect of postharvest short hot-water rinsing and brushing treatment on decay and quality of Strawberry fruit. *Journal of Food Quality*, 33, 262-272.

Johnson D.S., & Ridout M.S. (2000). Effects on the quality of stored apple fruit. *Fruit and vegetable quality: An integrated view*, 67-84.

Kähkönen M., Hopia A., & Heinonen M. (2001). Berry phenolics and their antioxidant activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49, 4076-4082.

Kajdžanoska M., Petreska J., & Stefova M. (2011). Comparison of different extraction solvent mixtures for characterization of phenolic compounds in strawberries. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59, 5272-5278.

Kalt W. (2001). Health functional phytochemicals of fruit. *Horticultural Reviews*, 27, 269-315.

Kalt W., Forney C.F., Martin A., & Prior R.L. (1999). Antioxidant capacity, Vitamin C, phenolics, and anthocyanins after fresh storage of small fruits. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47(11), 4638–44.

Kangasjärvi J., Talvinen J., Utriainen M., & Karjalainen R. (1994). Plant defence systems induced by ozone. *Plant Cell Environment*, 17, 783–794.

Karaca H., & Velioglu S. (2007). Ozone applications in fruit and vegetable processing. *Food Reviews International*, 23, 91-106.

Karadag A., Ozcelik B., & Saner S. (2008). Review of methods to determine antioxidant capacities. *Food Analytical Methods*, 2, 41–60.

Kelly K.L. (1943). Color designations for lights. *Journal of the Optical Society of America*, 33, 627-631.

Kramer B., Wunderlich J., & Muranyi P. (2016). Recent findings in pulsed light disinfection. *Journal of Applied Microbiology*, 122, 830-856.

Krishnamurthy K., Tewari J.C., Irudayaraj J., & Demirci A. (2010). Microscopic and spectroscopic evaluation of inactivation of *Staphylococcus aureus* by pulsed UV light and infrared heating. *Food and Bioprocess Technology*, 3, 93-104.

Lagunas-Solar M.C., Piña C., Macdonald J.D., & Bolkan L. (2006). Development of pulsed UV light processes for surface fungal disinfection of fresh fruits. *Journal of Food Protection*, 69(2), 376–84.

Lara I., García P., & Vendrell M. (2006). Post-harvest heat treatments modify cell wall composition of strawberry (*Fragaria x ananassa* Duch.) fruit. *Scientia Horticulturae*, 109, 48-53.

Lara I., Belge B., & Goulao L. (2014). The fruit cuticle as a modulator of post-harvest quality. *Postharvest Biology and Technology*, 87, 103-112.

Leistner L. (1992). Food preservation by combined methods. *Food Research International*, 25, 151-158.

Liang-Yu C., Chien-Wei C., & Ji-Yuan L. (2013). Effect of esterification condensation on the Folin–Ciocalteu method for the quantitative measurement of total phenols. *Food Chemistry*, 170, 10–15.

Lopes-da-Silva F., Escribano-Bailón M.T., Pérez Alonso J.J., Rivas-Gonzalo J.C., & Santos-Buelga C. (2007). Anthocyanin pigments in strawberry. *LWT – Food Science and Technology*, 40, 374–382.

Lozano R. (1978). El color y su medición. America Lee, Buenos Aires, Argentina.

Luksiene Z., Buchovec I., & Viskelis P. (2013). Impact of High-Power Pulsed Light on microbial contamination, health promoting components and shelf life of strawberries. *Food Technology and Biotechnology*, 51, 284-292.

Lurie S. (1998). Postharvest heat treatments. *Postharvest Biology and Technology*, 14, 257-269.

Lurie S., & Pedreschi R. (2014). Fundamental aspects of postharvest heat treatments. *Horticulture Research*, 1, 14030; doi:10.1038/hortres.2014.30.

Lyshede O. B. (1982). Structure of the outer epidermal wall in xerophytes. En: Cutler D. F., Alvin K. L., & Price, C. E. (Eds.), *The plant cuticle*, Academic Press, Londres. Pág. 87-98.

MacDonald-Wicks L., Wood L., & Garg M. (2006). Methodology for the determination of biological antioxidant capacity *in vitro*: a review. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 86, 2046-2056.

MacDougall D.B. (2002). Colour measurement of food. En: MacDougall D.B. (ed.). *Colour in food. Improving quality*. CRC Press LLC, Boca Raton, Estados Unidos.

Marquenie D., Michiels C.W., Geeraerd A.H., Schenk A., Soontjens C., Van Impe F.F., & Nicolaï B.M. (2002). Using survival analysis to investigate the effect of UV-C and heat treatment on storage rot of strawberry and sweet cherry. *International Journal of Food Microbiology*, 73, 187-196.

Marquenie D., Geeraerd A.H., Lammertyn J., Soontjens C., Van Impe J.F., & Michielis C.W. (2003). Combination of pulsed white light and UV-C or mild heat treatment to inactivated conidia of *Botrytis cinerea* and *Monilia fructigena*. *International Journal of Food Microbiology*, 85, 185-196.

Martínez G.A., & Civello P.M. (2008). Effect of heat treatments on gene expression and enzyme activities associated to cell wall degradation in strawberry fruit. *Post-harvest Biology and Technology*, 49, 38-45.

Meyers K.J., Watkins C.B., Pritts M.P., & Liu R.H. (2003). Antioxidant and antiproliferative activities of strawberries. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(23), 6887-92.

Minas I.S., Karaoglanidis G.S., Manganaris G.A., & Vasilakakis M. (2010). Effect of ozone application during cold storage of kiwifruit on the development of stem-end rot caused by *Botrytis cinerea*. *Postharvest Biology and Technology*, 58, 203-210.

Mohsenin N.N., & Mittal J.P. (1997). Use of rheological terms and correlation of compatible measurements in food texture research. *Journal of Texture Studies*, 8, 395-408.

Moreiras O., Carvajal A., Cabrera L., & Cuadrado M. (2001). Tablas de composición de alimentos. Ediciones Pirámide, Madrid, España.

Musto M., Satriano M.L. (2010). Fruit responses to postharvest heat treatment time: characterization of heat-treated strawberry (*Fragaria x ananassa*) cv. 'Candongá' fruits. *Agronomy Research*, 8(1), 815-826.

Muthukumaappan K., Halaweish F., Naidu A.S. (2000) *Ozone*. En: Naidu A.S. (Ed.), *Natural food anti-microbial Systems*, CRC Press, Boca Raton, Florida. Pág. 783-800.

Nadas A., Olmo M., & García J.M. (2003). Growth of *Botrytis Cinerea* and strawberry quality in ozone-enriched atmospheres. *Journal of Food Science*, 68(5), 1798–1802.

Navas M.J., Jiménez-Moreno A.M., Bueno J.M., Sáez-Plaza P., & Asuero A.G. (2012). Analysis and antioxidant capacity of anthocyanin pigments. Part IV: Extraction of anthocyanins. *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, 42, 313-342.

Ngadi M., Bajwa S.S., & Alakali, J. (2012). Minimally Processed Foods. En: Simpson, B.K., Nollet L., Toldrá F., Benjakul, S., Paliyath, G., & Hui Y.H.(eds), *Food Biochemistry and Food Processing*. Willey-Blackwell, Reino Unido. Pág.746-762.

Nunes C.N., & Emond J.P. (2007). Relationship between weight loss and visual quality of fruits and vegetables. *Proceedings of the Florida State Horticultural Society*, 120, 235-245.

Octavia L., & Choo W.S. (2017). Folate, ascorbic acid, anthocyanin and colour changes in strawberry (*Fragaria × Annanasa*) during refrigerated storage. *LWT - Food Science and Technology*, 86, 652–59.

Odriozola-Serrano I., Soliva-Fortuny R., & Martín-Belloso O. (2009). Influence of storage temperature on the kinetics of the changes in anthocyanins, vitamin C, and antioxidant capacity in fresh-cut strawberries stored under high-oxygen atmospheres. *Journal of Food Science*, 74, 184-191.

Odriozola-Serrano I., Soliva-Fortuny R., & Martín-Belloso O. (2010). Changes in bioactive composition of fresh-cut strawberries stored under superatmospheric oxygen, low-oxygen or passive atmospheres. *Journal of Food Composition and Analysis*, 23, 37-43.

Onopiuk A., Póltorak A., Moczowska M., Szpicer A., & Wierzbicka A. (2017). The impact of ozone on health-promoting, microbiological, and colour properties of *Rubus Ideaus* raspberries. *CyTA - Journal of Food*, 15(4), 563–73.

Ornelas-Paz J.J., Yahia E.M., Ramírez-Bustamante N., Pérez-Martínez J.D., Escalante-Minakata M.P., Ibarra-Junquera V., Acosta-Muñiz C., Guerrero-Prieto V., & Ochoa-Reyes E. (2013). Physical attributes and chemical composition of organic strawberry fruit (*Fragaria x Ananassa* Duch, Cv. Albion) at six stages of ripening. *Food Chemistry*, 138(1), 372–81.

Ou B., Hampsch-Woodill M., & Prior, R. (2001). Development and validation of an improved oxygen radical absorbance capacity assay using fluorescein as the fluorescent probe. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49, 4619-4626.

Padmanabhan P., Mizran A., Sullivan J.A., & Paliyath G. (2016). Strawberries. En: Caballero B., Finglas P.M., & Toldrá F., *Encyclopedia of Food and Health*, Academic Press, Oxford. Pág. 490-494.

Pangloli P., & Hung Y. (2013). Reducing microbiological safety risk on blueberries through innovative washing technologies. *Food Control*, 32, 621–625.

Pascual A., Llorca I., & Canut A. (2007). Use of ozone in food industries for reducing the environmental impact of cleaning and disinfection activities. *Trends in Food Science and Technology*, 18, 29-35.

Patil S., & Bourke P. (2012). Ozone processing of fluid foods. En: Cullen P.J., Tiwari B.K., & Valdramidis V.P.(eds). *Novel Thermal and Non-Thermal Technologies for Fluid Foods*. Academic, Londrés. Pág. 225-261.

Paul R.E. (1990). Postharvest heat treatments and fruit ripening. *Postharvest News Info*, 1, 355-363.

Pérez A.G., Sanz C., Ríos J.J., Olías R., & Olías M. (1999). Effects of ozone treatment on postharvest strawberry quality. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47, 1652–56.

Perkins-Veazie P., (1995). Growth and ripening of strawberry fruit. *Horticultural Reviews*, 17, 267-297.

Pombo M.A., Rosli H.G., Martínez G.A., & Civello P.M. (2011). UV-C treatment affects the expression and activity of defense genes in strawberry fruit (*Fragaria x ananassa*, Duch.). *Postharvest Biology and Technology*, 59, 94-102.

Pongener A., Sharma S., & Purbey S.K. (2018). Heat treatment of fruits and vegetables. *Postharvest Disinfection of Fruits and Vegetables*, 9, 179-196.

Posé S., Kirby A.R., Mercado J.A., & Quesada M.A. (2012). Structural characterization of cell wall pectin fractions in ripe strawberry fruit using AFM. *Carbohydrate Polymers*, 88(3), 882-890.

Prior R., Wu X., & Schaich K. (2005). Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 53 (10), 4290–4302.

Prusky D., Alkan N., Miyara I., Barad S., Davidzon M., Kobiler I., Brown-Horowitz S., Lichter A., Sherman A., & Flu, R. (2010). Mechanisms modulating post-harvest pathogen colonization of decaying fruits. En D. Prusky & M. L. Gullino (Eds), *Postharvest Pathology*, Springer Science+Business Media B.V, Nueva York. Pág. 43-55.

Ramos-Villaruel A.Y., Aron-Maftei N., Martín-Belloso O., & Soliva-Fortuny R. (2012). Influence of spectral distribution on bacterial inactivation and quality chang-

es of fresh-cut watermelon treated with intense light pulses. *Postharvest Biology and Technology*, 69, 32-39.

Ramos B., Miller F.A., Brandão T.R.S., Teixeira P., & Silva C.L.M. (2013). Fresh fruits and vegetables-An overview on applied methodologies to improve its quality and safety. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 20, 1-15.

Rawson A., Patras A., Tiwari B.K., Noci F., Koutchma T., & Brunton, N. (2011). Effect of thermal and non-thermal processing technologies on the bioactive content of exotic fruits and their products: Review of recent advances. *Food Research International*, 44, 1875-1887.

Re R., Pellegrini N., Proteggente A., Pannala A., Yang M., & Rice-Evans C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology & Medicine*, 26, 1231-1237.

Reboullat S., & Peleg M. (1998). Selected physical and mechanical properties of commercial apple cultivars. *Journal of Textures Studies*, 19, 217-230.

Rekika D., Khanizadeh S., Deschênes M., Levasseur A., Charles M.T., Tsao R., & Yang R. (2005). Antioxidant capacity and phenolic content of selected strawberry genotypes. *HortScience*, 40(6), 1777-81.

Roberts P., & Hope A. (2003). Virus inactivation by high intensity broad spectrum pulsed light. *Journal of Virological Methods*, 110, 64-65.

Rodriguez-Mateos A., Heiss C., Borges G., & Crozier A. (2014). Berry (Poly)phenols and cardiovascular health. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62, 3842-3851.

Romanazzi G., Smilanick J.L., Feliziani E., & Droby S. (2016). Integrated management of postharvest gray mold on fruit crops. *Postharvest Biology and Technology*, 113, 69-76.

Rosli H.G., Civello P.M., & Martínez G.A. (2004). Changes in cell wall composition of three *Fragaria x ananassa* cultivars with different softening rate during ripening. *Plant Physiology and Biochemistry*, 42, 823-831.

Rover M.R., & Brown R.C. (2013). Quantification of total phenols in bio-oil using the Folin-Ciocalteu method. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis*, 104, 366-371.

Rowan N., MacGregor S.J., Anderson J.G., Fouracre R.A., McIlvaney L., & Farish O. (1999). Pulsed-light inactivation of food-related microorganisms. *Applied and Environmental Microbiology*, 65, 1312-1315.

Salucci M., Lázaro R., Maiani G., Simone F., Pineda D., & Ferro-Luzzi A. (1999). The antioxidant capacity of selected foods and the potential synergisms among their main antioxidant constituents. *Natural Antioxidants and Anticarcinogens in Nutrition, Health and Disease*, 283–90.

Sămeș D., Maretić M., Lugarić I., Mešić A., Salopek-Sondi B., & Duralija B. (2016). Assessment of the differences in the physical, chemical and phytochemical properties of four strawberry cultivars using principal component analysis. *Food Chemistry*, 194, 828-834.

Samykan K, Pang E., & Marriott P.J. (2013). Genotypic and Environmental effects on flavor attributes of ‘Albion’ and ‘Juliette’ strawberry fruits. *Scientia Horticulturae*, 164, 633–42.

Sandermann H.J., Ernst D., Heller W., & Langebartels C. (1998). Ozone: an abiotic elicitor of plant defense reactions. *Trends in Plant Science Reviews*, 3, 47-50.

Sharma R.R., & Demirci A. (2003). Inactivation of *Escherichia coli* O157:H7 on inoculated alfalfa seeds with pulsed ultraviolet light and response surface modelling. *Journal of Food Science*, 68, 1448-1453.

Shin Y., Liu R.H., Nock J.F., Holliday D., & Watkins C.B. (2007). Temperature and relative humidity effects on quality, total ascorbic acid, phenolics and flavonoid concentrations, and antioxidant activity of strawberry. *Postharvest Biology and Technology*, 45(3), 349–57.

Sies H. (1997). "Oxidative stress: Oxidants and antioxidants". *Experimental physiology*, 82 (2), 291–295.

Silva J.L., Marroquin E., Matta F.B., Garner J.O. & Stojanovic J. (2005). Physicochemical, carbohydrate and sensory characteristics of highbush and rabbiteye blueberry cultivars. *Journal of Science and Food Agriculture*, 85, 1815–1821.

Silveira A.C., Oyarzún D., & Escalona V. (2018). Oxidative enzymes and functional quality of minimally processed grape berries sanitised with ozonated water. *International Journal of Food Science and Technology*, 53(6), 1371–80.

Slinkard K., & Singleton V.L. (1977). Total phenol analyses: automation and comparison with manual methods. *American Journal of Enology and Viticulture*, 28, 49-55.

Sui Y., Wisniewski M., Droby S., Norelli J., & Liu J. (2016). Recent advances and current status of the use of heat treatments in postharvest disease management systems: Is time to turn up the heat?. *Trends in Food Science & Technology*, 51, 34-40.

Suutarinen J., Änäkäinen L., & Autio K. (1998). Comparison of light microscopy and spatially resolved Fourier Transform Infrared (FT-IR) microscopy in the examination of cell wall components of strawberries. *LWT – Food Science and Technology*, 31, 595-601.

Sy K.V., McWatters K.H., & Beuchat L.R. (2005). Efficacy of gaseous chlorine dioxide as a sanitizer for killing *Salmonella*, yeasts, and molds on blueberries, strawberries, and raspberries. *Journal of Food Protection*, 68, 1165-1175.

Szczesniak A.S., & Smith B.J. (1969). Observation on strawberry texture a three-pronged approach. *Journal of Texture Studies*, 1(1), 65-89.

Szczesniak A.S. (2002). Texture is a sensory property. *Food quality and Preference*, 13 (4), 215-225.

Takeshita K., Sibato J., Sameshima T., Fukunaga S., Isobe S., Arihara K., & Itoh M. (2003). Damage of yeast cells induced by pulsed light irradiation. *International Journal of Food Microbiology*, 85, 151-158.

Toivonen P.M.A., & Brummell, D.A. (2008). Biochemical bases of appearance and texture changes in fresh-cut fruit and vegetables. *Postharvest Biology and Technology*, 48, 1-14.

Tulipani S., Armeni T., Giampieri F., Alvarez- Suarez J.M., Gonzalez- Paramás A.M., Santos-Buelga C., Busco F., Principato G., Bompadre S., Quiles J.L., Mezzetti B., & Battino M. (2014). Strawberry intake increases blood fluid, erythrocyte and monomolecular cell defences against oxidative challenge. *Food Chemistry*, 156, 87-93.

Urban L., Chabane Sari D., Orsal B., Lopes M., Miranda R., Aarrouf J. (2018). UV-C light and pulsed light as alternatives to chemical and biological elicitors for stimulating plant natural defenses against fungal diseases. *Scientia Horticulturae*, 235, 452-459.

Vicente A.R., Martínez G.A., Civello P.M., & Chaves A.R. (2002). Quality of heat-treated strawberry fruit during refrigerated storage. *Postharvest Biology and Technology*, 25, 59-71.

Vicente A.R., Costa M.L., Martínez G.A., Chaves A.R., & Civello P.M. (2005). Effect of heat treatments on cell wall degradation and softening in strawberry fruit. *Postharvest Biology and Technology*, 38, 213-222.

Waldron K.W., Smith A.C., Parr A.J., Ng A., & Parker M.L. (1997). New approaches to understanding and controlling cell separation in relation to fruit and vegetable texture. *Trends in Food Science and Technology*, 8, 213-221.

Wang T., MacGregor S.J., Anderson J.G., & Woolsey G.A. (2005). Pulsed ultraviolet inactivation spectrum of *Escherichia coli*. *Water Research*, 39, 2921-2925.

Wekhof A. (2000). Desinfection with flash lamps. *PDA Journal of Pharmaceutical Science and Technology*, 54, 264-276.

Welch C., Wu Q., & Simon J. (2008). Recent advances in anthocyanin analysis and characterization. *Current Analytical Chemistry*, 4, 75-101.

Wijiratnam R.S.W., Hewajulige I.G.N., & Abeyrane N. (2005). Postharvest hot water treatment for the control of Thielaviopsis black rot of pineapple. *Postharvest Biology and Technology*, 36, 323-327.

Zapata M.E., Rovirosa A., & Carmuega E. (2016). Cambios en el patrón de consumo de alimentos y bebidas en Argentina, 1996 – 2013. *Salud colectiva*, 12 (4), 473-486.

Zazzetta M., Mairosser A., Kiehr M., Luciani C., & Conci V. (2018). Enfermedades en el cultivo de frutilla en el valle bonaerense del Río Colorado. Informe INTA Hilario Ascasubi período 2015 – 2016.

Zeynep B., Guzel-Seydima, Greene A.K., & Seydima A.C. (2003). Use of ozone in the food industry. *LWT- Food Science and Technology*, 37, 453-460.

Zhang X., Zhang Z., Wang L., Zhang Z., Li J., & Zhao C. (2011). Impact of ozone on quality of strawberry during cold storage. *Frontiers of Agriculture in China*, 5, 356-360.

Zhu Q., Nakagawa T., Kishikawa A., Ohnuki K., & Shimizu K. (2015). *In vitro* bioactivities and phytochemical profile of various parts of the strawberry (*Fragaria x ananassa* var. Amaou). *Journal of Functional Foods*, 13, 38-49.